

心停止ドナー肝グラフトに対する間葉系幹細胞移植の効果に関する研究

著者	笹嶋 秀憲
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第18515号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00126021

心停止ドナー肝グラフトに対する間葉系幹細胞移植の効果に
関する研究

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

外科病態学講座消化器外科学分野

笹嶋 秀憲

目次

1. Abbreviations	3
2. 要約	5
1. 研究背景	8
2. 研究目的	13
3. 研究方法	14
4. 研究結果	29
5. 考察	35
6. 結語	46
7. 文献	47
8. 図	57
9. 表	87
10. Figure legend	92

Abbreviations

MSC	Mesenchymal stem cell
ADSC	Swine adipose derived stem cells
PBS	phosphate buffered salts
PCR	Polymerase chain reaction
HB	Heart-beating
DCD	Donation after cardiac death
PNF	Primary graft non-function
ATP	Adenosine triphosphate
ROS	Reactive oxygen species
IL	Interleukin
TNF	Tumor Necrosis Factor
PGE1	Prostaglandin E1
HGF	Hepatocyte growth factor
FGF	Fibroblast growth factor
EGF	Epidermal growth factor
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
UW	University of Wisconsin solution

AST	Aspartate aminotransferase
ALT	Alanine aminotransferase,
LDH	Lactate dehydrogenase
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assey
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
ADP	Adenosine diphosphate
AMP	Adenosine monophosphate
HE	Hematoxylin-Eosin
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling
VEGF	Vascular endothelial growth factor

要約

【目的】肝移植適応の拡大に伴い世界的にドナーが不足している．この問題に対して心停止ドナーからの肝移植研究が行われており実際に臨床応用されつつあるが，心拍動下ドナーに比し移植後に高率に合併症を来すことが知られている．様々な試みが検討されているものの，心停止ドナーからの肝移植における標準的な基準や手技は未だ確立していないのが現状である．

本研究の目的は，心停止下摘出肝グラフトに対する間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cell: MSC）投与の効果を検証することである．まず，基礎実験として今回MSCとして用いたブタ脂肪幹細胞（swine adipose derived stem cells; ADSC）について肝細胞への分化能をPCR（polymerase chain reaction）法で検証した．ラット肝*ex vivo*灌流実験にてMSC投与による温阻血再灌流障害改善効果を検討すると同時に，細胞投与に伴う類洞血管抵抗増大の可能性を検証した．ブタ実験においては臨床応用に向けて心停止下摘出肝移植を行い，生存率を含めた解析を行った．

【方法】実験Ⅰ：MSCとして用いたADSCの肝細胞への分化能をPCR法にて確認した．

実験Ⅱ：雄性Wistarラットを用い以下の4群に分けて*ex vivo*灌流実験を行った．

(1)心拍動群(Heart-beating; HB群)：心拍動下に肝摘出する群．(2)心停止群(Donation after cardiac death; DCD群)：心停止下に肝摘出する群．(3)ADSC-1群：心停止下に

肝摘出するが，再灌流直後に ADSC 2.0×10^5 を投与する群．(4) ADSC-2 群：心停止下に肝摘出するが，再灌流直後に ADSC 1.0×10^6 を投与する群．全ての群では死戦期を経て心停止後 30 分間の温阻血時間を置き肝臓を摘出し，6 時間冷保存後， 37°C で 120 分間の灌流を行った（60，120 分後に検体を採取）．

実験Ⅲ：雄性ブタを用い以下の 3 群に分け実験を行った．(1) 心拍動群 (Heart-beating; HB 群)：心拍動下に肝摘出，同所性肝移植する群．(2) 心停止群 (Donation after cardiac death; DCD 群)：心停止下に肝摘出，同所性肝移植する群．(3) ADSC 群：心停止下に肝摘出し同所性肝移植するが，再灌流 2 時間後に経門脈的に ADSC 1.0×10^7 を投与する群．

【結果】 実験Ⅰでは分化誘導されることで ADSC が Albumin を発現するようになった．実験Ⅱでは DCD 群に対し ADSC-1 群で 60 分後流出液中の LDH 値の有意な低下を認め，ADSC-2 群で胆汁産生量に有意な改善を認めた．また DCD 群に比べ ADSC-1, 2 両群で類洞内皮構造が保たれ，有意なアポトーシスの抑制効果を認めた．実験Ⅲにては ADSC 群では DCD 群と比較し，移植後早期グラフト機能不全の頻度が減少し術後 7 日目の生存率が有意差をもって改善した．また，DCD 群に比べて ADSC 群では再灌流 7 時間後血清 IL- 1β 値の有意な低下を認め，類洞内皮構造も保たれ有意なアポトーシスの抑制効果を認めた．

【結論】 MSC は心停止ドナー肝を用いた肝移植において全身炎症を抑えるとともに肝グラフト viability も改善させたと考えられる．MSC は心停止ドナー肝グラフトを

用いた肝移植においてその成績を改善させる有効な手段になり得ることが示唆された。

研究背景

現代における肝移植手術は末期肝疾患や急性肝不全に対する確立した治療法である。しかし一方で、移植適応の拡大と移植希望者の増加のために世界的にドナーが不足しており、移植待機患者の死亡数増加が問題となっている。心停止ドナー

(Donation after cardiac death: DCD) を含めたいわゆるマージナルドナーからの肝移植はドナー不足を解決する有効な方法の一つと考えられ、既に欧米では臨床応用されており、ヨーロッパにおいては肝移植の約20%を占める国もある¹⁻³。

心拍動下 (Heart Beating: HB) ドナーからの肝移植に比べ DCD 肝移植は移植後早期グラフト機能不全 (primary graft non-function: PNF) や胆管合併症、再移植が高率に発生するとされる^{1,4}。DCD は Maastricht 分類により病院到着時に死亡状態であったもの (category1), 心肺蘇生が成功しなかったもの (category2), 生命維持装置の中断 (category3), 脳死状態下での心停止 (category4) に分類されており⁵, category1・2 が uncontrolled DCD, category3・4 が controlled DCD とされている。uncontrolled DCD は最も多くのドナー数の増加が期待できるが、呼吸停止から心停止に至るいわゆる死戦期を長く被るため移植後合併症が controlled DCD に比べ高率に生じることが分かっている⁶。それに比べ controlled DCD は肝摘出まで時間的余裕があるためグラフトの温阻血時間を短縮できることもあり、実際に臨床応用を開始している国もある。もしも category2 の uncontrolled DCD と controlled DCD だけでも安定して移植可能にする

手法を確立できたならば、ドナーソースは十分に増えることが予想され、ドナー不足問題の解決に大きく寄与することとなる。

心停止下摘出肝グラフトの第一の問題点は、心停止後から冷保存液灌流に至るまでの温阻血障害である。温阻血後の低酸素状態によって細胞内のadenosine triphosphate (ATP) が枯渇し、それに伴いATPase依存性ポンプの機能不全から肝細胞の膨化や類洞内皮の脱落を来し、類洞腔の狭小化から再灌流後の微小循環障害を引き起こす原因となる²。第二の問題点は、移植後の血流再開時に起こる再灌流障害である。つまり、再灌流時のKupffer細胞の活性化に伴う炎症性サイトカインの放出（サイトカINSTORM）、好中球や補体の活性化などにより直接細胞障害や類洞内凝固が引き起こされる⁷⁻⁹。さらに第三の問題点として、温阻血障害と再灌流障害の影響下においてはXanthine oxidase系や電子伝達系などから活性酸素種（reactive oxygen species : ROS）が多く産生されてしまうことがあげられる。このROSがDNAや細胞膜上のリン脂質やタンパク質などへ直接的な酸化的傷害をもたらす^{10,11}、細胞内カスケードのメディエーターとして働くことで肝細胞障害や類洞内皮障害をきたす。心停止下摘出肝グラフトの移植では、これら微小循環障害と再灌流障害の相互作用が重度の機能不全をもたらす要因と考えられている（図1）。

このような背景から、温阻血再灌流障害の軽減を目指して様々な試みが検討されている。心停止前のドナーに対する処置として、薬剤投与によるKupffer細胞の機能抑制¹²、Kupffer細胞の除去^{13,14}、選択的Interleukin-1 β (IL-1 β)・Tumor Necrosis

Factor- α (TNF- α) 産生阻害剤の投与^{15,16}, 抗炎症活性を有する薬剤の投与^{17,18}などが挙げられる。また心停止後の処置としてcardio-pulmonary bypassによるrecirculation^{1,19}, 冷保存中・冷保存後のmachine perfusion^{20,21}, 酸素化バッファーによる冷保存前灌流²²⁻²⁵や移植前灌流²⁶, 更に冷保存前灌流液への添加薬剤としてビリベルジン^{27,28}, フリーラジカルスカベンジャー^{22,29,30}, Prostaglandin E₁ (PGE₁)²³⁻²⁵などが検討され有効性が報告されている。しかし, uncontrolled DCDからの移植の場合, 病院到着時死亡例や蘇生失敗例から移植臓器摘出を行うため, 心停止前にドナーへ薬剤投与をはじめとする処置を行うことはドナー自身の治療と関わりのない処置を行うことの倫理的問題がある。また, 灌流・保存に関しては心停止前のドナーに対し各種薬剤の安全性や特殊処置のための器械操作における技術的問題, 臓器搬送における煩雑さなどは実際の臨床応用への解決すべき課題が多く, 心停止ドナーからの肝移植における標準的な基準や手技は未だ確立していないのが現状である。

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) は中胚葉性組織に由来する体性幹細胞であり, 自己再生能と多分化能を有することで知られている。MSCが分化誘導されることにより骨細胞, 軟骨細胞, 心筋細胞, 脂肪細胞等の中胚葉由来細胞に分化するだけでなく, 外胚葉由来のグリア細胞や内胚葉由来の肝細胞に分化することも示されてきている³¹⁻³³。近年MSCは, 自己免疫疾患や糖尿病に加え, 肝線維化や非アルコール性脂肪性肝硬変等, 種々の肝疾患に対する治療手段として用いられるようになってきている³⁴⁻³⁹。MSCの作用機序としては主に以下の2点が示されている。ま

ず1点目としてMSCがhepatocyte growth factor (HGF), fibroblast growth factor

(FGF), epidermal growth factor (EGF) 等の種々のgrowth factorを放出することで内因性の細胞修復プログラムが活性化し、障害を有する臓器において組織修復機能が向上するとされる⁴⁰⁻⁴²。次に2点目として、MSCが免疫調節系の細胞を刺激することで免疫抑制作用を示すことにより過度の炎症を抑えることができ、高度の炎症に伴う組織障害を防ぐとされている^{34,43,44}。

虚血再灌流障害モデル、大量肝切除後、過少グラフト肝移植等さらに様々な病態に対して MSC を用いる研究が行われている^{31,40,41,43}。Tian らはマウスを用いた心停止ドナー肝グラフトを用いた肝移植実験で、MSC 投与が術後の生存率を改善させた、と報告した³⁴。この結果を受け私はより臨床に近い死戦期を経た心停止ドナー肝グラフトを用いた肝移植実験を大動物であるブタを用いて行い、MSC 投与の効果を検証することを考えた。しかし MSC 投与についてその最適な経路や最適な細胞量に関しては様々な報告があり、一定の見解は得られていない。Sang らはブタを用いた急性肝不全モデルに対して、経門脈的 MSC 投与が他の経路を介した MSC 投与に比べ肝機能と生存期間を有意に向上させたと報告している⁴⁵。一方で、経門脈的 MSC 投与が類洞閉塞を引き起こす危険性も示唆されている⁴⁶。心停止ドナー肝グラフトでは温阻血再灌流障害のために特に類洞内皮が脆弱になっているためその危険性についても十分な検討が必要となる。本研究では実験Ⅱでは、ラット肝を用いた *ex vivo* 灌流実験を行い、MSC 投与によるグラフトへの改善効果を評価すると同時に細胞投与による類洞

血管抵抗増大の可能性を検証した．実験Ⅲでは臨床応用を前提としてブタ肝移植実験を行い，大動物の生体における MSC 投与の効果を検証した．実験Ⅲにおける MSC の投与経路や細胞数に関しては，先行研究と実験Ⅱの結果を基に設定して施行した

39,45,46,47,48 .

研究目的

本研究の目的は、心停止下摘出肝グラフトに対するMSC投与の移植後急性期における有効性と安全性を検証することである。

まず基礎実験では、今回MSCとして用いたブタ脂肪幹細胞の肝細胞への分化能をPCR法で検証することを目的とした。

ラット実験においては、心停止下摘出肝グラフトに対して移植後のグラフト機能を推定・評価する方法として広く用いられる*ex vivo*灌流実験にて、MSC投与による温阻血再灌流障害改善効果と細胞投与に伴う類洞血管抵抗増大の可能性を検証することを目的とした。

ブタ実験においては臨床応用に向けて心停止下摘出肝移植を行い、MSCによる温阻血再灌流障害の制御の解析を目的とした。

研究方法

すべての実験は、東北大学研究・安全委員会実験動物専門委員会により承認を受け、国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定に則って実施した。（2018-医動-025）

細胞分離・培養方法

投与する MSC として容易に分離・培養可能な ADSC (swine adipose derived stem cells) を選択した（図 2）。実験Ⅱのドナー手術時に家畜ブタ大網を 100mg 以上採取し、脂肪幹細胞キット（Biomirakoubou Co. Ltd, Tokyo, Japan）を用いてキットの使用説明書に準じて ADSC を分離した。このキットに含まれるポリエチレン-ポリプロピレン芯鞘構造の不織布にハイドロキシアパタイトを塗布した 3 次元構造基材に脂肪組織をトラップして培養することで、組織から細胞外マトリックスを豊富に産生する増殖速度の大きい脂肪幹細胞が分離可能とされている。まず、採取した大網を PBS (phosphate buffered salts) で 2 回洗浄した後ハサミでトリミングして 100mg の脂肪組織を測り取った。前述の 3 次元構造基材を、前処置として 5ml の 80%エタノールに 5 分間、5ml の PBS に 4 分間浸した。50ml チューブにセルストレイナーを装着し、セルストレイナーの上に前処置済みの 3 次元構造基材を置いた。さらに、20ml PBS で 3 次元構造基材を洗浄の後 100mg の脂肪組織を 3 次元構造基材の上に置いた。専用の培地中（表

1) に脂肪組織を乗せた 3 次元構造基材を移し、1 週間培地交換せずに 37°C /5%CO₂ インキュベーターで培養した。1 週間後脂肪組織を乗せた 3 次元構造基材を取り出して 50ml チューブに移し、10ml の PBS で 2 回洗浄した。脂肪組織を除去し 3 次元構造基材のみを新しい 50ml チューブに移し、2ml のトリプシンを加え 37°C /5%CO₂ インキュベーターで 5 分間培養した。50ml チューブに 20ml の PBS を加えた後 3 次元構造基材を破棄した。このチューブを 24°C、1200rpm で 3 分間遠心分離し、上澄みを吸引した。沈殿物を専用の培地 2ml に溶解し dish に移し、37°C /5%CO₂ インキュベーターで培養した。なお、脂肪組織を乗せた 3 次元構造基材を 1 週間培養した培地についても基材を取り出した後はそのまま 37°C /5%CO₂ インキュベーターで培養した。両培地ともに培地交換を 3 日毎に行った。顕微鏡による観察を続け、線維芽細胞様の ADSC が増殖しているのを確認した。図 2 に示す通り接着性の細胞である。70~80% confluent に達したところで適宜継代した。以上の手順で分離することで高純度で脂肪幹細胞を分離することが可能であり、最初の分離から 2 週間で 1×10^6 cells 以上の脂肪幹細胞が得られるとされている。ADSC の特異的な細胞表面抗原としては CD29, CD44, CD105 等が挙げられる⁴⁹。

実験 I : ADSC 分化誘導実験

PCR, quantitative PCR (qPCR) を行い、ADSC の肝細胞への分化能を確認した。p=3 (passage=3) まで通常と同様に培養した ADSC (100mm dish) が 50% confluent に達し

たところで、培地を通常培地から分化誘導培地（表 2）に交換し、継代をせずにさらに 15 日間培養した⁴⁹。Control として通常培地でも同期間培養した。15 日後、dish に ISOGEN II（Nippon gene Co. Ltd, Tokyo, Japan）により ADSC の RNA（ribonucleic acid）を抽出してエッペンチューブに集め、RNA 量を計測した。Random Primer 9, 5×first strand buffer, 0.1M DDT, M-MLV（Thermo Fisher Scientific Co. Ltd, Waltham, USA）, dNTP mix（TaKaRa Bio Co. Ltd, Shiga, Japan）を順次に加えて incubate し、RNA から complementary DNA を合成した。プライマーとして Albumin を用い（プライマー配列は 5'-GCCTCTTGTGGATGAGCCTA-3', 5'-GTTTCAGGACCAGGGACAGAT-3'）, 5×Go Taq reaction buffer Green, Go Taq DNA polymerase（Promega Co. Ltd, Fitchburg, USA）を付加して PCR を施行し、complementary DNA を増幅させた。1%アガロースゲルを用いた電気泳動を行い、PCR 産物を確認した。同時に SYBR green super Mix（TaKaRa Bio Co. Ltd, Shiga, Japan）を用いて qPCR を行い、DNA 量を定量化した。（サイクル数はすべて 30cycle。定量は $\Delta \Delta CT$ 法を用いた。）

実験 II：ラット肝灌流実験

1. 実験動物および実験デザイン

体重 246-340g の雄性 Wistar ラット（Nihon SLC Co. Ltd, Shizuoka, Japan）を用い、移植後のグラフトの状態を推定、評価するために肝移植研究において広く用いられている *ex vivo* 灌流モデルである Gore's の回路を採用し *ex vivo* 灌流実験を行った⁵⁰。全て

の群で死戦期を経て心停止後 30 分間の温阻血時間を置き、肝臓を摘出し、6 時間の冷保存時間をおいた後、移植を想定し常温（37℃）で 120 分間再灌流した。ADSC 投与について、投与なし、ADSC 2.0×10^5 , ADSC 1.0×10^6 に分けて施行した (DCD 群, ADSC-1, -2, 各群 n=5, 図 3)。Control 群として心拍動下に肝臓を摘出した HB 群を設定した。

2. 肝摘出法

ラットは塩酸メデトミジン（Nippon Zenyaku Kogyo Co. Ltd, Fukushima, Japan）0.15 mg/kg + ミダゾラム（Teva Pharma Japan Inc. Tokyo, Japan）2 mg/kg + 酒石酸ブトルファノール（Meiji Seika Pharma Co. Ltd, Tokyo, Japan）2.5 mg/kg の混合麻酔薬による腹腔内投与で全身麻酔後、陰茎背静脈よりヘパリン（AY Pharmaceuticals Co. Ltd, Tokyo, Japan）1000 U/kg を投与し、横切開にて開腹した。シリコンチューブ（シラスコン外径 1mm-内径 0.5mm; Kaneka Medix Co. Osaka, Japan）を接続した 22G サーフロー針外筒（TERUMO Co. Tokyo, Japan）を総胆管に挿入した。その後、横隔膜切開により両側開胸し呼吸停止させ、死戦期を経て心停止を誘導した。温阻血の間、腹部臓器の乾燥防止と保温のため開腹部位をラップで被覆した。心停止後 30 分間の温阻血時間をおいた後、肝動脈を結紮し、門脈に 14G サーフロー針外筒を挿入し、肝上部下大静脈を切開し 4℃ 乳酸リンゲル液（Lactec Injection; Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., Tokushima, Japan）20 ml, 4℃ University of Wisconsin solution（UW 液; DuPont

Pharmaceuticals, Wilmington, DE, USA) 20 ml で経門脈的に肝臓内の血液をウォッシュアウトし、肝を摘出、4°C UW 液中で 6 時間冷保存した。冷保存中に肝下部大静脈を結紮し、肝上部大静脈に 14G サーフロー針外筒を挿入した。

3. 灌流方法

ex vivo 灌流として、37°C で、95%O₂/5%CO₂ 飽和 Krebs-Henseleit 液を用いて体外灌流を行った。体外灌流は、非循環型灌流装置である Perfusion System PS-1 (Hugo Sachs Elektronik-Havard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Germany) を用いて行った。摘出した肝臓を、37°C の moist chamber の上に置き、門脈・肝上部大静脈を装置の灌流液流入路・流出路にそれぞれ接続し、灌流液流入路を Pressure Transducer (Research Grade Blood Pressure Transducer, 110VAG/60 Hz; Hugo Sachs Elektronik-Havard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Germany) で常時計測しながら 7mmHg の低圧で経門脈的に灌流した⁵¹⁻⁵⁵。

臓器保存液は UW 液の他に Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate 液、Celsior 液があるが、これらには UW 液より有効性が高いという報告はなく^{54,55}、UW 液の使用は現在移植の臨床の場において標準となっているため、本研究では UW 液を冷保存液として使用した (表 3)。

4. 細胞投与方法

再灌流を開始した直後のタイミングで、ADSC (p=5~7) を生理食塩水 2cc に溶解し回路の側管より 1 分間かけてワンショットした。

5. 検体採取

灌流開始から 60 分後と 120 分後に肝上部下大静脈の流出液を採取し、生化学検査等の検討まで-80℃で保存した。また再灌流 120 分後に全肝組織を各種解析用に分割、検体処理を行った。肝左葉を採取し、光学顕微鏡用の検体としてホルマリンで固定した。残りの肝組織を液体窒素にてフリーズクランプし、-80℃で保存した。

6. 検討項目

(1) 胆汁産生量，門脈灌流液量

移植を想定した常温灌流 120 分後にグラフトの機能評価指標として胆汁産生量を測定した。灌流中に総胆管から流出した胆汁量を測定し、ラット肝重量当たりの胆汁産生量を算出した。同様に肝上部下大静脈から流出した灌流液量を測定し、ラット肝重量当たりの門脈灌流液量として算出した。

(2) 生化学的検査

灌流液中の Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), Lactate dehydrogenase (LDH) 濃度を、市販キットを用いた酵素比色法にて測定した (AST, ALT: Transaminase C II -test Wako; Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Tokyo, Japan. LDH: esper

LDH liquid; Nipro Corporation, Osaka, Japan). 測定機器は日立ダブルビーム分光光度計 U-2910 (Hitachi High-Tech Science Corporation, Tokyo, Japan) を使用した.

(3) 炎症性サイトカイン

灌流液中の tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) の濃度を, 市販キットを用いて enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で測定した (TNF- α : ELISA Kit KRC3011 Quantikine; Invitrogen, California, USA. IL-1 β : Rat IL-1 β PikoKine ELISA Kit : Cosmo Bio Co. Ltd, Tokyo, Japan). 測定はマルチスペクトロフォトメーター Viento XS (Sumitomo Dainippon Pharma Co. Ltd, Osaka, Japan) を使用した.

(4) 灌流液中細胞接着因子

細胞接着因子である intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) は, 温阻血再灌流障害によって, 肝細胞や類洞内皮細胞に発現が増強することが知られている⁵⁶⁻⁵⁸. 灌流液中の可溶性 ICAM-1 を市販 ELISA キット (sICAM-1: Quantikine ELISA Kit; R&B systems, MN, USA) を用いて測定した.

(5) 肝組織中 ATP 測定

Seya らの方法^{59,60}に準じて, 得られた肝組織検体を用いて, アデニンヌクレオチドを測定した. 凍結保存肝組織を 0.5N 過塩素酸中でホモジナイズし, 1500 rpm \times 5 分間冷却遠心し, 上清を回収した. 水酸化カリウムを用いて pH を 6.0-7.6 に滴定しアデニンヌクレオチドを抽出した後, さらに 3000 rpm \times 10 分間冷却遠心し, 上清 1ml を回収した. 孔径 0.45 μ m のセルロースアセテート膜フィルター (03CP045AS; Toyo Roshi

Kaisha, Tokyo, Japan) を通して遠心タイプセルロース膜限外濾過カートリッジ (ULTRACENT30; TOSOH, Tokyo, Japan) に注入, 3000 rpm × 30 分間冷却遠心し濾過されたものを-20℃で保存し, 測定時に解凍した. 4℃で 60mM リン酸緩衝液 (pH 5.0) を溶出液とし, 1.0 ml/min の流量で Wakosil-II5C18HG カラムを使用して, high-performance liquid chromatography (HPLC) 法によって検体中の ATP・Adenosine diphosphate (ADP)・Adenosine monophosphate (AMP) 量を測定した (Jusco HPLC analyzer system Gilliver900 series, UV970; Jusco, Tokyo, Japan). Adenosine 5'-triphosphate sodium salt, Adenosine 5'-diphosphate sodium salt, Adenosine 5'-monophosphate sodium salt (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA) を 10μmol/l に調整したものをスタンダードとし, 検体 20 μl 中の ATP・ADP・AMP 量 (スタンダードは 200 pmol) を測定し, ADP/ATP 比を算出した.

(6) 組織学的検討

検体採取後ホルマリンで固定し, エタノールで脱水した後, パラフィン包埋した. ヘマトキシリン-エオジン Hematoxylin-Eosin (HE) 染色し, 光学顕微鏡及び全自動顕微鏡 (BIOREVO BZ-9000; KEYENCE Co. Osaka, Japan) にて組織学的検討を行った. 温阻血再灌流障害を被った肝組織は多発する巣状の壊死と広範な類洞循環障害を認めるため, 微小循環の評価として開存類洞面積比を検討した. 光学顕微鏡下約 200 倍拡大で各ラットにつき無作為に 10 視野抽出し, まず門脈および中心静脈の内腔面積を計測した (A 領域). その後白黒二元化し黒色領域 (肝構成細胞) の面積を測定し,

(全体の面積 - 黒色領域 - A 領域)/(全体の面積 - A 領域)を算出し、開存類洞面積比とした。画像処理は Image J ソフトウェア (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) を用いて行った。

また、アポトーシス検出として市販キット (Apop Taq Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit; Chemicon International Inc. Cam, USA) を用いて terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) 染色を行った^{61,62}。光学顕微鏡下約 200 倍拡大で各切片につき、無作為に 10 視野×3 切片の計 30 視野を抽出し、その陽性細胞数を計測し、1mm² 当たりの陽性細胞数を算出した。

(7) 統計学的検討

結果は平均値±標準偏差 (Standard deviation: SD) で表記した。多群間比較は一元配置分散分析および Tukey-Kramer の Honestly significant difference (HSD) 検定を行い、 $P<0.05$ を有意差ありとした。統計処理はすべて JMP pro ソフトウェア (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行った。

実験Ⅲ：ブタ肝移植 (+細胞移植) 実験

1. 実験動物と実験デザイン

体重 25-33kg の F1 ブタ (Landrace×Large White) (Nihon SLC Co. Ltd, Shizuoka, Japan) を用い、以下の 3 群 (各群 n=5) に分け、肝移植実験を行った (図 4)。

(1) 心拍動群 (Heart-beating; HB 群)：心拍動下に肝臓を摘出し移植する群。

(2) 心停止群 (Donation after cardiac death; DCD 群) : 心停止下に肝臓を摘出し移植する群.

(3) ADSC 投与群 (swine adipose derived stem cell; ADSC 群) : 心停止下に肝臓を摘出し移植する群. 肝移植を行い閉腹した後, 門脈血流再開の 2 時間後のタイミングで ADSC 1.0×10^7 を経門脈的に投与する群.

全ての群で, 摘出した肝グラフトは 4 時間の冷保存を置き, その後肝移植 (+細胞移植) 実験を施行した.

2. ドナー手術

麻酔導入としてメデトミジン 0.1mg/kg とミダゾラム 0.1mg/kg を筋注し, イソフルレン 3% (Abbvie GK, Tokyo, Japan) と酸素の吸入麻酔下に気管切開を行い, イソフルレン 1.5~2%で麻酔維持し, 以下の手術操作を行った. 血液サンプルの確保と中心静脈内への薬剤投与のために右外頸静脈を, 動脈圧のモニタリングのために右総頸動脈をそれぞれ確保した. 正中切開にて開腹し, 総胆管にカテーテルを留置した. ヘパリン 300 U/kg を静脈内投与した後, 脾静脈及び腹部大動脈にカニューレションした.

DCD 群と ADSC 群では, 臭化ベクロニウム (MSD K.K. Tokyo, Japan) を 4~8 mg を投与後に横隔膜切開により両側開胸し呼吸停止させ, 死戦期を経て心停止を誘導した. 心停止は収縮期血圧 $< 40\text{ mmHg}$ と定義し, また死戦期は呼吸停止から心停止までの間と定義し, その時間を記録した. 肝グラフトを摘出し, 4°C に冷却した UW 液 1000ml

に 4 時間単純浸漬保存した．HB 群では死戦期を経ずに心拍動下に同様の操作にて肝臓を摘出した．

3. バックテーブル手術

摘出肝グラフトを 4°C に冷却した UW 液中で，肝上部下大静脈，門脈，肝下部下大静脈，肝動脈の各吻合部を形成し，必要であれば肝実質の損傷を修復した．

4. レシピエント手術

ドナーと同様に全身麻酔を施行し，以下の手術操作を行った．血液サンプルの確保と中心静脈内への薬剤投与のため左右外頸静脈を確保し，動脈圧のモニタリングのため右総頸動脈を確保してカテーテルを留置した．術前に制酸剤としてオメプラゾールナトリウム（Nichi-Iko Pharmaceutical Co. Ltd, Toyama, Japan）10mg と，抗生物質としてセフォチアム塩酸塩（Nipro corporation, Osaka, Japan）0.25g を経静脈的に投与した．

正中切開で開腹し，ヘパリン 300 U/kg を静注した後，肝を摘出したが，無肝期にはアンスロンバイパスチューブ（Toray Industries, Inc. Tokyo, Japan）を用い，門脈血については脾静脈から左外頸静脈へ，肝下部下大静脈血については右外腸骨静脈から右外頸静脈へと受動的バイパスをおいた⁶³．無肝期の直前に抗炎症作用を目的としてメチルプレドニゾロンコハク酸エステルナトリウム（Yell Pharmaceutical Co. Ltd, Tokyo, Japan）250mg を経静脈的に投与した．肝移植は同所性に行い，連続縫合で肝上部下大静脈，

門脈，肝下部大静脈の順に端々吻合を行い，最後に顕微鏡下に肝動脈を結節縫合で端々吻合を行った．肝上部大静脈と門脈吻合後に再灌流した．再灌流直前にアシドーシスの補正として炭酸水素ナトリウム注射液（Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd, Tokyo, Japan）50ml を経静脈的に投与した．再灌流 1 時間後に約 1cm³ の肝組織を採取した．胆管の再建は行わず，胆汁はカニュレーションチューブを用いて外瘻化させ，閉腹した．

レシピエントは手術後 7 日目をエンドポイントとして犠牲死させ，同様に肝組織を採取した．コントロール不能の胸腹水により延命が困難と思われた場合にも犠牲死とした．なお，当科先行研究にてブタの同種肝移植では短期生存実験において免疫寛容があるという報告があり⁶⁴⁻⁶⁷，ステロイドを除く免疫抑制剤は使用しなかった．

5. 細胞投与法

閉腹前に脾静脈からカニュレーションチューブを挿入・留置し，皮下トンネルを作成しつつ体外に誘導した．このチューブより細胞投与に先行して門脈塞栓の予防として約 1 時間プロスタンディン点滴静注用（Ono Pharmaceutical Co. Ltd. Osaka, Japan）を 10μg/時間の速度で持続注射した後，門脈血再灌流 2 時間後のタイミングで生理食塩水 10cc に溶解した ADSC (p=4) 1.0×10^7 を 5 分間かけてワンショットした．

6. 細胞標識法

(1) 細胞染色液 CM-dil

病理標本にて肝組織中に ADSC の存在を確認する目的で細胞標識を行った. 今回用いた細胞膜染色液 CM-dil (Thermo Fisher Scientific Co. Ltd, Waltham, USA) は, 細胞膜における側方拡散と, それを補足する生体組織における能動的な色素輸送によって細胞を均一に標識し, 細胞の生存性には顕著な影響を与えないとされる. CM-dil 1mg あたり 1ml のエタノールに溶解して保存するが, これをさらに PBS で 1000 倍に希釈して CM-dil 染色液として用いた.

(2) ADSC 染色の手順

ADSC 投与時, ADSC を dish から剥離する直前にまず dish から培地をすべて除去した上で dish 内に CM-dil 希釈液を培地と同量入れた. dish を 37°C で 5 分間 incubate の後 4°C で 15 分間静置した. その後 dish から CM-dil 希釈液を除去し, 新しい培地に交換した.

7. 検討項目

(1) 各群背景

各群のレシピエント体重, 肝グラフト重量, 死戦期, 無肝期 (レシピエント肝の脈管のクランプから, グラフト肝の再灌流までの間と定義) を比較した.

(2) 移植後生存率

移植後 7 日目をエンドポイントとしてレシピエントの生存率を比較した.

(3) 血清生化学検査

採血した全血は血清を分離し、解析時まで-80℃で保存した。血清中の AST, ALT, LDH 濃度を、ラットと同様に市販キットを用いた酵素比色法にて測定した。開腹時、再灌流 1 時間後 (1h)、再灌流 3 時間後 (3h)、再灌流 5 時間後 (5h)、再灌流 7 時間後 (7h)、手術 1 日後 (Postoperative Day1: POD1)、手術 3 日後 (Postoperative Day3: POD3)、手術 7 日後 (Postoperative Day7: POD7) のタイミングでの血清を測定しているが、3h, 5h, 7h に関しては Control である HB 群では測定していない。また、3h, 5h, 7h に関しては実験施行の途中から追加した項目でもあったため、DCD 群ではこの部分のデータはすべて n=3 となっており ADSC 群でも 5h, 7h のタイミングは n=4 となっている。

(4) 炎症性サイトカイン

TNF- α , IL-1 β , Interleukin-6 (IL-6) の血清中濃度を、市販キットを用いて enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で測定した (TNF- α : TNF α /TNFSF1A, Porcine ELISA Kit Quantikine; R&D systems, Minneapolis, USA. IL-1 β : IL-1 β /IL-1F2, Porcine ELISA Kit Quantikine; R&D systems, Minneapolis, USA. IL-6: IL-6, Porcine ELISA Kit Quantikine; R&D systems, Minneapolis, USA.). (4) における血清測定のタイミングは開腹時を除いてすべて (3) 生化学検査と同じタイミングであった。

(5) 組織学的検討

検体採取後、ホルマリンで固定しエタノールで脱水した後、パラフィン包埋した。

ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色し光学顕微鏡にて組織学的検討を行った。

アポトーシス検出のため市販キットを用いて TUNEL 染色を行った^{61,62}。光学顕微鏡下約 200 倍拡大で各切片につき無作為に 10 視野 ×3 切片の計 30 視野を抽出し、その陽性細胞数を計測し、1mm² 当たりの陽性細胞数を算出した。ただし、HE 染色・TUNEL 染色ともに確実にサクリファイスを施行できた個体のみについて検討した。

(n=3×3 群)

7. 統計学的検討

結果は平均値±標準偏差 (SD) で表記した。多群間比較は一元配置分散分析及び Tukey-Kramer の HSD (honestly significant difference) 検定を行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。また生存曲線は Kaplan-Meier log-rank test にて検定し、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。統計処理はすべて JMP Pro ソフトウェア (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行った。

研究結果

実験Ⅰ：ADSC 分化誘導実験

PCR では，分化誘導培地にてわずかながら Albumin のバンド形成を認めた．qPCR では，分化誘導培地において通常培地に比べ約 4 倍量の Albumin の PCR product を発現し，ADSC が Albumin を発現したと考えられた ($P < 0.05$, $n=3$) (図 5)．ADSC の肝細胞への分化能を確認できた．

実験Ⅱ：ラット肝灌流実験

ラット体重，灌流後の肝重量，死戦期の長さはすべての群間で有意差を認めなかった (表 3)．

1. 門脈灌流液量，胆汁産生量

門脈灌流液量は，HB 群 (531.93 ± 138.32) に比べ DCD 群 (321.97 ± 73.86) と ADSC-2 群 (342.97 ± 94.19) で有意に減少した ($P < 0.05$)．

また，DCD 群と ADSC-1 群 (372.22 ± 86.97)，ADSC-2 群との間では門脈灌流液量に有意差を認めなかった ($P = 0.8603$, $P = 0.9874$) (図 6A)．したがって，ADSC 投与による回路内の抵抗の上昇は起こらなかった．この結果により，類洞内の微小循環障害の程度までは評価できないものの，少なくとも ADSC 投与に伴う類洞血管抵抗の著

明な上昇は起こらなかったものと考えられた。

胆汁産生量は、HB 群に比べ DCD 群で有意に減少した (115.34 ± 13.25 vs. 76.70 ± 26.75 , $P=0.0432$)。一方で、ADSC-2 群 (116.48 ± 10.68) では増加し、DCD 群に対し有意差を認めた ($P=0.0365$) (図 6B)。

2. 灌流液中肝逸脱酵素

AST 値 (IU/l), ALT 値 (IU/l) は、60 分後・120 分後ともにすべての群間で有意差を認めなかった。LDH 値 (IU/l) は、60 分後において HB 群に比べ DCD 群で有意に増加した (48.74 ± 19.95 vs. 162.58 ± 85.34 , $P=0.0206$)。一方で、ADSC-1 群 (45.62 ± 18.84) では DCD 群と比べ LDH 値の増加が有意に抑制された ($P=0.0172$)。120 分後においては、すべての群間で有意差を認めなかった (図 7)。

3. 灌流液中炎症性サイトカイン

灌流液中の TNF- α 濃度 (pg/ml) , 灌流液中 IL-1 β 濃度 (pg/ml) は、60 分後・120 分後ともにすべての群間で有意差を認めなかった (図 8)。

4. 灌流液中細胞接着因子

可溶性 ICAM-1 濃度 (pg/ml) は、60 分後・120 分後ともにすべての群間で有意差を認めなかった (図 9)。

5. 肝組織中 ADP/ATP 比

肝組織中 ADP/ATP 比は HB 群に比べ、ADSC-2 群において有意に高値を示した.

(5.68 ± 2.40 vs. 9.69 ± 2.68 , $P=0.035$) (図 10).

6. 組織学的検討

(1) HE 染色

HB 群では類洞腔が広く保たれており、類洞構造は維持されていた. DCD 群では類洞内皮細胞の脱落と肝細胞の膨化により類洞は狭小化していた. 中心静脈領域を中心に肝細胞の著明な空胞変性を広範囲で認めた. 一方、ADSC-1、ADSC-2 群ではこれらの変化が軽度抑制されていた (図 11).

開存類洞面積比 (%) の解析では DCD 群 (7.57 ± 2.34) に比べ HB (18.57 ± 3.35 , $P < 0.0001$), ADSC-1 (18.92 ± 2.58 , $P < 0.0001$), ADSC-2 群 (15.74 ± 2.30 , $P = 0.001$) で有意に高い開存率を示し、類洞腔が維持されていた. (図 12)

(2) TUNEL 染色

TUNEL 陽性細胞数 (個/ mm^2) は、HB 群に比べ DCD 群では有意に増加していた (31.41 ± 18.59 vs. 257.03 ± 168.06 , $P=0.0035$). また ADSC-1 群 (67.85 ± 19.75), ADSC-2 群 (68.83 ± 5.15) では、DCD 群に比べ TUNEL 陽性細胞数が有意に少なかった (P

<0.01, 図 13, 14).

実験Ⅲ：ブタ肝移植実験

各群のレシピエント体重，肝グラフト重量，死戦期，無肝期を比較した．各群間で有意差は認めなかった（表 4）．

1. 移植後生存率

HB 群は全例が 7 日間生存した．DCD 群は全例が 12 時間以内に primary graft non-function (PNF) のため死亡した．ADSC 群は 5 例中 3 例が 7 日間生存し，1 例は 4 日目（88 時間後），1 例は 2 日目（30 時間後）に PNF のため死亡した．ADSC 群は DCD 群と比べ有意に生存率が改善した（ $P=0.0005$ ）（図 15）．

PNF の症例では，胆汁流出が停止し，エコーで門脈血流が急激に減少した．こうした門脈血流の途絶は温阻血再灌流障害に起因する門脈血栓形成のためと考えられた．死後解剖では血性腹水を多量に認め，門脈血栓形成に伴う門脈圧亢進，および凝固障害のためと考えられ，これらの所見から死因を PNF と判断した．

2. 血清肝逸脱酵素

血清 AST は，すべての群において再灌流 1 時間後より手術後 1 日目にかけて上昇し，手術後 1 日目にピークに達し，その後漸減した．HB 群に比べ ADSC 群において

再灌流 1 時間後で有意に高値を示した ($P=0.0119$) (図 16).

血清 ALT は、すべての群において再灌流 1 時間後より手術後 1 日目にかけて上昇し、手術後 1 日目にピークに達し、その後漸減した。HB 群に比べ ADSC 群において再灌流 1 時間後で有意に高値を示した ($P=0.0065$) (図 16).

血清 LDH は、すべての群において再灌流 1 時間後より手術後 1 日目にかけて上昇し、手術後 1 日目にピークに達し、その後漸減した。各々の時点ですべての群間で統計学的有意差を認めなかった (図 16).

3. 血清炎症性サイトカイン

血清 TNF- α は、各々の時点ですべての群間で統計学的有意差を認めなかった。

血清 IL-1 β は、DCD 群に比べ ADSC 群において再灌流 7 時間後で有意に低値を示した ($P=0.0425$)。他の時点においてはすべての群間で統計学的有意差を認めなかった (図 17)。

血清 IL-6 は、DCD 群に比べ HB 群において再灌流 1 時間後で有意に低値を示し、ADSC 群に比べ HB 群において手術 7 日目に有意に低値を示した (図 17)。

4. 組織学的検討

a. HE 染色

犠牲死時の標本で、DCD 群で肝細胞の膨化が著明であったが、HB 群および ADSC

群は比較的肝構造が保たれていた (図 18).

b. TUNEL 染色

犠牲死時に生検された組織中の TUNEL 陽性細胞数は, DCD 群に比べ HB 群, ADSC 群で有意に減少していた (1084.87 ± 292.73 vs. 94.28 ± 33.99 , 116.04 ± 17.42 , ともに $P < 0.002$, 各群: $n = 3$, 図 19, 20).

c. ADSC 確認 (CM-dil)

ADSC 群については肝組織中の同部位において光学顕微鏡 (HE 染色所見) と蛍光顕微鏡の両方で観察した. 肝組織中において肝細胞質内や類洞内皮・内腔に ADSC が存在するものと考えられた (矢印, 図 21A). コントロールとして DCD 群も蛍光顕微鏡による観察を行い, 蛍光色を示すものがないことを確認した (図 21B).

考察

本研究では、心停止下摘出肝グラフトに対する MSC 投与の効果をラット *ex vivo* 灌流実験およびブタ肝移植実験にて検討した。まずラット肝灌流実験では DCD 群に比べ MSC 投与群において、灌流液中 LDH の低下・胆汁量の増加・TUNEL 陽性細胞数の減少・類洞内皮障害の緩和という所見が得られ、MSC 投与が心停止下摘出肝グラフト再灌流において障害にならないばかりでなく *viability* を改善させる可能性が示唆された。またブタ肝移植実験においては DCD 群に比べ MSC 投与群において血清中 IL-1 β の低下・TUNEL 陽性細胞数の減少という所見が得られるとともに、PNF の頻度が減少し、有意に生存率が上昇した。本研究はラットとブタを用いて死戦期を経た心停止下摘出肝グラフトに対する MSC 投与の有益性と類洞血管抵抗増大の可能性を検証した、世界で初めての報告である。

今回実験モデルとして臨床現場で発生頻度が高い *uncontrolled DCD* からの肝移植を想定し、ラットおよびブタともに両側開胸、呼吸器停止から死戦期を経て心停止を誘導するモデルを採用した。温阻血再灌流障害に関する研究で用いられる DCD 実験モデルは塩化カリウムの投与や脈管のクランプ、あるいは失血によって心停止を誘導しているものが散見されるが、死戦期を経た場合虚血状態に至った腸管に由来する炎症性サイトカインなどの影響を受けより強い温阻血再灌流障害を受けることが報告されている⁶⁸。そのため当科では死戦期を経た心停止ドナーモデルがより臨床に近いと

考えており，本研究においてもこの実験モデルを採用した．ラット肝移植モデルにおいて移植後にグラフトが十分に機能する温阻血時間の限界は，死戦期を経ない場合に 30–60 分と報告されており^{51,52}，本研究では平均約 10 分間の死戦期を経た温阻血時間を 30 分間に設定した．一方，ブタ肝移植モデルについては当科の先行実験において死戦期を経た温阻血時間を 10 分に設定した場合，特に処置を施行しない DCD 群においては 7 日間生存率が 0%であった³⁰．従ってブタに関しては温阻血時間を 10 分に設定しても十分に強い温阻血再灌流障害モデルを作成できると考え，本研究にてもブタ実験は温阻血時間を 10 分に設定した．

実験 I において今回 MSC として用いた ADSC の分化能を確認しているが，これはあくまで実験 II・IIIを行う上で前提条件となる ADSC の potential を確認する意図で行ったものである．方法・結果に示した通り，肝細胞へと分化させた ADSC が Albumin を発現するのには 15 日程度日数を要する．今回の実験 II・IIIにおいては細胞投与からエンドポイントまでそれぞれ 2 時間・7 日と短期間であったため，ADSC が Albumin を発現し実験結果に影響を及ぼしたとは考えられない．今後長期に渡る生存実験を施行することがあればその効果も期待できる可能性はあると考える．

MSC の最適な投与経路については様々な議論があるが，大きく分けると経静脈と経門脈の 2 つが挙げられる．Sang らは，ブタを用いた急性肝不全モデルに対して経門脈的 MSC 投与が他の経路を介した MSC 投与に比べ肝機能と生存期間を有意に向上させたと報告している．その理由として，急性肝不全の早期において経門脈的 MSC

投与が他経路に比べて最も速やかに効果を発揮し、抗アポトーシスと肝再生に機能するからではないかと述べている⁴⁵。Cao らはブタを用いた急性肝不全モデルに対して経門脈と経頸静脈両方からの MSC 投与を試みているが、経門脈投与群のみが 7 日目の生存率を有意に改善したと報告した⁴⁷。また、Li らはブタを用いた劇症肝不全モデルに対して経門脈と経末梢静脈両方からの MSC 投与を試みており、経末梢静脈投与群とコントロール群は 96 時間以内に全例が死亡したが、経門脈投与群のみは 13/15 例で 6 か月以上の長期生存を得たと報告している³⁹。本研究においても私は経門脈的に MSC を投与することによって他の経路に比べてより速やかに MSC が肝に到達することができると MSC の生着率が上がり、MSC の組織修復機能が最も効率的に発揮されるのではないかと予想した。このような理由から本研究では MSC の投与経路として経門脈を選択した。

門脈から細胞を投与する際に類洞閉塞を引き起こす危険性が示唆されている。死戦期を経た心停止ドナー肝グラフトでは温阻血再灌流障害のために特に類洞内皮が脆弱になっているため、その危険性は他研究で見受けられる肝不全モデル等と比べても高いと予測される。MSC を用いた多くの小動物実験において、動物体重 1kg あたり、 $2 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ の MSC を投与されていることがほとんどである^{46,48}。しかし、虚血再灌流障害によって極めて類洞内皮細胞が脆弱となった DCD 肝グラフトに対しては投与すべき適切な細胞数についてほとんど知られていない。本研究の実験Ⅱにおいては、先行研究を参考に、体重約 300g のラットに対して 2×10^5 と 1×10^6 （体重 1kg あたり

6.6×10⁵ と 3.3×10⁶) の 2 パターンの細胞数の投与を試みた^{46,48}. 7mmHg の定圧を保つ灌流実験であったが, HB 群を除く 3 群において流出液量に有意差が見られなかった.

この結果は MSC 投与群において少なくとも広範な類洞閉塞が起こらなかったことを示している. さらに光学顕微鏡所見においても MSC 投与群は DCD 群に比べ, 類洞内腔の狭小化が緩和されていた. これらの結果によりラット体重 1kg あたり 6.6×10⁵~3.3×10⁶ 個程度の門脈からの MSC 投与では広範な類洞閉塞は起きなかったものと考えられた. また, DCD 群に比べ MSC 投与群において胆汁量の増加・60 分後の流出液中 LDH 値の低下・TUNEL 陽性細胞数の減少という所見が得られた. 胆汁産生は類洞内皮細胞や肝細胞, 胆管内皮細胞などが正常に作用し多段階のプロセスを経て観察される指標であり, 肝グラフトの viability 改善の指標として合理的であると言え LDH は組織損傷の指標として重要である⁵⁰. さらに, TUNEL 染色ではアポトーシスに至った肝細胞を視覚的に直接観察することができる. したがって実験Ⅱの結果によって MSC が DCD の肝細胞や類洞内皮細胞の損傷を抑えグラフトの機能を改善させた可能性が示唆された. ただし実験Ⅱにおいて MSC 投与群には ADSC-1 (2×10⁵) 群と ADSC-2 (1×10⁶) 群の 2 群があり TUNEL 陽性細胞数に関しては ADSC-1 群と ADSC-2 群ともに DCD 群に比べて有意に減少していたが, 60 分後の流出液中 LDH 値に関しては ADSC-1 群のみで DCD 群に比べて有意に低下しており胆汁量に関しては ADSC-2 群のみで DCD 群に比べて有意に増加していた. そのため, 投与する細胞数として 2×10⁵ と 1×10⁶ のどちらがより有効であったかという点については明らかにできなかった.

また、ADP/ATP 比については当初 MSC 投与群で DCD 群に比して低下することが期待されたが実際の結果ではむしろ上昇し、特に ADSC-2 群では著名に上昇して HB 群との間で有意な高値となった。この結果からやはり MSC 投与による広範な類洞閉塞の所見はなかったものの投与する細胞数が増えることによって類洞内の微小なレベルでの循環障害が徐々に現れた可能性は否定できなかった。

先行研究によると肝線維症・肝炎のブタ肝臓を用いた MSC 投与実験においては 1 体辺り $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ を投与し、生存率の向上等の良好な結果を得ているものがほとんどである^{39,47}。実験Ⅱにおいて ADSC-2 群においては ADP/ATP 比がかなり高値となっており、類洞閉塞までは生じていないが類洞内の微小なレベルでの循環障害が徐々に現れた可能性があり、ラットの DCD 肝にとって 1×10^6 （ブタの DCD 肝に換算すると 7×10^7 ）という投与細胞数は危険域に近いことが予想される。従って、ブタの DCD 肝にとっての 7×10^7 という投与細胞数の安全性が確信できなかったため、安全域を確保するために実験Ⅲで用いる MSC の細胞数は 1×10^7 に設定した。

実験Ⅱにおいては移植を想定した再灌流の直後に MSC を投与している。実験Ⅲについても実験Ⅱと揃えて再灌流直後に MSC 投与することが望ましかったが、実験Ⅲにおいては再灌流時に体内の血液が一気に肝に流入することで一時的に低血圧の状態となるため、その間集中した血圧の管理が必要となる。今回人員の問題からこの血圧管理と細胞の準備を 1 人で行わなければならなかったため再灌流直後に MSC 投与するのは不可能であり、MSC 投与は再灌流 2 時間後のタイミングとなった。この 2 時

間のギャップが結果にどれほど関係するのかについては不明であったが、DCD 群全例で 24 時間以内に PNF が見られたことを考えると、もし今後可能になるのであればより早めに MSC 投与が行われ、その効果を発現させることが望ましいのではないかと考えている。

本研究の実験Ⅲでは、DCD 群に比べ MSC 投与群において、PNF の頻度が減少し、有意に生存率が上昇した。Wang ら、Yu らは、MSC が HGF の発現を増加させることで肝再生を促進し、肝保護効果をもたらす可能性がある、と報告している^{31,69}。また Du らは MSC が VEGF (vascular endothelial growth factor) の発現を増すことで肝間質細胞や類洞内皮細胞の再生を促すと述べている⁴³。本研究の実験Ⅲにおいて DCD 群に比べ MSC 投与群では光学顕微鏡所見にて TUNEL 陽性細胞数が有意に減少し、HE 染色にても比較的肝構造が保たれていた。したがって MSC が HGF と VEGF の発現量を上昇させたことで直接的に細胞再生・組織修復を促進させ肝細胞や類洞内皮細胞のアポトーシスを抑え DCD 肝グラフトの viability を改善させた可能性があると考えられた。さらに Du らは MSC が IL-1 β を含む炎症性サイトカインの発現を抑えることで抗炎症作用をもたらすとも述べている⁴³。本研究の実験Ⅲでは、DCD 群に比べて MSC 投与群において再灌流 7 時間後の IL-1 β 値が有意に低下していた。したがって、本研究においても投与した MSC が IL-1 β の発現を抑え、移植後早期のサイトカインストームを軽減させた可能性があると考えられた。これらの理由により実験Ⅲでは MSC 投与群において PNF の頻度の減少という結果がもたれられたものと推測してい

る．しかし肝酵素や炎症性サイトカインについてはわずか一部においてしか有意な改善が見られず，HGF と VEGF の定量に至っては数個体で検出限界を下回ってしまったため計測することができなかった．したがって PNF を減少させた理由について今回はあくまで推測することしかできず，特定するまでには至らなかった．なお，実験Ⅲの LDH 値に関しては HB 群の高値が目立つために実験Ⅱの結果と一見矛盾するようにも見受けられるが，すべての群間で有意差はないことから単なる値のばらつきを見ているだけと考えられた．実験Ⅲのような生体実験においては肝組織以外の部位での損傷が血清 LDH 値の変動に大きく作用するために AST や ALT に比べ LDH ではより値のばらつきが出やすかったものと考えている．また，DCD の病態として ROS の増大もグラフト viability を増悪させる重要な因子ではあったが，MSC が ROS の発生を抑えるという結果を示している先行論文が皆無であったため，本研究にては ROS 測定は施行しなかった．

今回投与した ADSC のサイズはシングルセルでは 10～20 μ m であった．顕微鏡所見からブタ肝臓の類洞内腔が大部分において 10～20 μ m であったことと併せて考えると，実験Ⅲにおいて経門脈的に投与した ADSC は類洞内皮にトラップされる形でそのほとんどは肝内に留まっていたのではないかと考えている．肝外に出て行った分もありその割合を厳密に測ることは今回できていないが，図 21,22 の蛍光顕微鏡所見にて肝内に観察される ADSC の数が肺内に観察される ADSC をかなり上回っていた印象であったことから，投与したうち 80～90% の ADSC は肝内に留まっていたものと推測

している.

本研究においては私はブタ大網の細胞のみしか単離することができなかった. よってラット肝灌流実験にブタ大網の細胞を投与することとなり結果として異種細胞移植となり, MSC の組織修復効果を的確に評価できるとは考えにくいモデルとなった. しかし当初実験Ⅱの目的は臨床実験での投与細胞数を決定することにあつたため, cell obstruction による有害事象の検証さえ出来れば目的は達成できると考えこの方法を選択した. なお ADSC のサイズはシングルセルの状態ではラット・ブタともに $10 \sim 20 \mu\text{m}$ であり⁷⁰, 類洞内腔の幅に関しても実際の顕微鏡所見からみてラット・ブタともに大部分で $10 \sim 20 \mu\text{m}$ であつたことを考えると, ラット肝にブタ由来 MSC を投与することによるサイズのギャップは特に生じないと考えられた. またラット肝灌流実験に関しては血液細胞を含まない Krebs-Henseleit 液で灌流しており, 灌流時間もわずか 2 時間であつたため拒絶反応に関しては無視できるものと考えた. MSC 生着までの時間のないラットモデルにおける LDH 値の有意な低下や胆汁産生量の有意な改善は予想外の結果であつた. これらの結果から, MSC は細胞増殖・修復が出来なくてもある程度の抗炎症反応を起こすことが間接的に推測されるが, 今後さらなる研究が必要である.

ブタ肝移植実験については, 移植肝臓に関しても MSC 投与に関しても同種他家移植となっている. 前述の通り当科先行研究にて, ブタの同種肝移植では短期生存実験において免疫寛容があるという報告があるため, DCD 群ではステロイドを除く免疫

抑制剤は用いなかった。したがって DCD 群と条件を均一にするため MSC 投与群でも免疫抑制剤は投与しなかった。そのため実験Ⅲでは厳密には MSC 投与に伴う拒絶反応の影響は評価できていない。ただし、そもそも MSC 投与に関しては MSC 自体が持つ免疫寛容の作用が働くため、その投与の際には免疫抑制剤の投与は必要ないという意見が多い^{33,44,71}。免疫抑制剤による上乗せ効果があるのかないのかという点については今後臨床応用するまでに更なる検討が必要であろう。

今回実験Ⅱでは、流出液中のサイトカインについては有意差を認めなかった。この理由の一つとして、投与した MSC のうち肝を通過して下大静脈から排出されてしまった分が少なからず存在するため、MSC の抗炎症効果が十分に表れなかった可能性も考えられた。

実験Ⅲでは、DCD 群に比べ MSC 投与群において、血清 IL-1 β 値は再灌流 7 時間後のみで低下し、他のタイミングでは有意差が見られなかった。また、TNF α と IL-6 に関しては DCD 群と MSC 投与群との間で有意差はみられなかった。この理由としては、温阻血再灌流により両群が受ける障害の程度が大きくかつばらつきがあることが原因の一つと推測される。一方、7 日目の生存率に関しても MSC 投与群で 3/5 に留まっており、臨床応用に発展させるためにはまだ十分な成果とは言えない。MSC の効果を最大限に引き出すためには、今後も心停止摘出下肝グラフトにとって最適な MSC 投与法（細胞数、投与経路、投与タイミング、細胞種等）について追いつめていく必要があると考える。なお、実験Ⅲは移植後 7 日目をエンドポイントとしたため、比較

的後期に発症し再移植の原因となる胆管合併症についての評価はできなかったが、臨床応用を考えると長期経過観察も必要であり今後の課題になると考えられた。

実際にヒトの DCD 肝移植において MSC を活用することを想定した際、DCD グラフト発生の連絡を受けてから MSC の採取・分離・培養を始めたのでは移植手術までに十分に増やすことができないため十分量を確保することは不可能と考えられる。本研究においても ADSC をブタ大網から分離してから 1.0×10^7 に増やすまで 20 日程度を要しており、この点が実臨床に向けて大きなハードルになる。対応策としては、あらかじめレシピエント本人か他人の MSC を採取・分離・培養して投与予定量まで増殖させてから凍結して保存しておくという手法が考えられる。この手法を用いることで DCD グラフト発生の連絡があってからすぐに MSC を十分量解凍し培養を再開すれば、移植手術時あるいは手術直後に MSC 投与をすることは理論上可能になると考えられる。ただし解凍してからの時間が比較的短い MSC が十分な活性を保っているかどうかに関しては不明であり、この点に関しても今後検討が必須な課題であるといえる。

本研究では、ラット肝灌流実験において、MSC 投与によって肝細胞、類洞内皮細胞のアポトーシスが抑えられ、心停止下摘出肝グラフトの viability が改善した可能性が示唆された。またブタ肝移植実験においては、MSC 投与によって PNF の頻度が減少し、DCD 群に比べて有意な生存率向上を認めた。今後の臨床応用に向けては、MSC の効果を十分に引き出すために、MSC の投与細胞数や経過観察期間の検討を含め、さ

らなる追加研究が必要となる．また，本研究においては MSC 投与がもたらす効果についての分子学的機序に関しては検討していないため，その点についても今後さらなる検証が必要である．

結語

心停止ドナー肝グラフトに対する MSC 投与の効果を検証するために、ラット肝灌流実験とブタ肝移植実験を行った。本実験の結果から MSC 投与が肝細胞と類洞内皮細胞のアポトーシスを抑えて肝組織保護・修復に働き、全身の炎症反応も抑えた可能性が示唆された。また、ブタ肝移植実験ではグラフト不全が有意に減少し生存率が改善した。

従って MSC は心停止ドナー肝グラフトを用いた肝移植においてその成績を改善させる有効な手段になり得ることが示唆された。

文献

1. Otero A, Gomez-Gutierrez M, Suarez F, et al. Liver transplantation from Maastricht category 2 non-heart-beating donors. *Transplantation*. 2003;76(7): 1068-1073.
2. Reddy S, Zilvetti M, Brockmann J, McLaren A, Friend P. Liver transplantation from non-heart-beating donors: current status and future prospects. *Liver Transpl*. 2004;10(10): 1223-1232.
3. Monbaliu D, Pirenne J, Talbot D. Liver transplantation using Donation after Cardiac Death donors. *Journal of hepatology*. 2012;56(2): 474-485.
4. Foley DP, Fernandez LA, Levenson G, et al. Biliary complications after liver transplantation from donation after cardiac death donors: an analysis of risk factors and long-term outcomes from a single center. *Ann Surg*. 2011;253(4): 817-825.
5. Kootstra G, Daemen JH, Oomen AP. Categories of non-heart-beating donors. *Transplant Proc*. 1995;27(5): 2893-2894.
6. Muiesan P, Girlanda R, Jassem W, et al. Single-center experience with liver transplantation from controlled non-heartbeating donors: a viable source of grafts. *Ann Surg*. 2005;242(5): 732-738.
7. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;284(1): G15-26.

8. Dogan S, Aslan M. Hepatic ischemia-reperfusion injury and therapeutic strategies to alleviate cellular damage. *Hepatol Res*. 2011;41(2): 103-117.
9. Bahde R, Spiegel HU. Hepatic ischaemia-reperfusion injury from bench to bedside. *Br J Surg*. 2010;97(10): 1461-1475.
10. Casini A, Ceni E, Salzano R, et al. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology*. 1997;25(2): 361-367.
11. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 2007;12(5): 913-922.
12. Shibuya H, Ohkohchi N, Seya K, Satomi S. Kupffer cells generate superoxide anions and modulate reperfusion injury in rat livers after cold preservation. *Hepatology*. 1997;25(2): 356-360.
13. Oikawa K, Ohkohchi N, Sato M, Masamune A, Satomi S. Kupffer cells play an important role in the cytokine production and activation of nuclear factors of liver grafts from non-heart-beating donors. *Transpl Int*. 2002;15(8): 397-405.
14. Tsukamoto S, Ohkohchi N, Fukumori T, et al. Elimination of Kupffer cells and nafamostat mesilate rinse prevent reperfusion injury in liver grafts from agonal non-heart-beating donors. *Transplantation*. 1999;67(11): 1396-1403.
15. Miyagi S, Ohkohchi N, Oikawa K, Satoh M, Tsukamoto S, Satomi S. Effects of Anti-

Inflammatory Cytokine Agent (Fr167653) and Serine Protease Inhibitor on Warm Ischemia-Reperfusion Injury of the Liver Graft. *Transplantation*. 2004;77(10): 1487-1493.

16. Sato M, Ohkohchi N, Tsukamoto S, et al. Successful liver transplantation from agonal non-heart-beating donors in pigs. *Transpl Int*. 2003;16(2): 100-107.

17. Kashiwadata T, Miyagi S, Hara Y, et al. Soluble Thrombomodulin Ameliorates Ischemia-Reperfusion Injury of Liver Grafts by Modulating the Proinflammatory Role of High-Mobility Group Box 1. *Tohoku J Exp Med*. 2016;239(4): 315-323.

18. Shimizu K, Miyagi S, Miyazawa K, et al. Resveratrol Prevents Warm Ischemia-Reperfusion Injury in Liver Grafts From Non-Heart-Beating Donor Rats. *Transplant Proc*. 2016;48(4): 1221-1225.

19. Jimenez-Galanes S, Meneu-Diaz MJ, Elola-Olaso AM, et al. Liver transplantation using uncontrolled non-heart-beating donors under normothermic extracorporeal membrane oxygenation. *Liver Transpl*. 2009;15(9): 1110-1118.

20. Dutkowski P, Furrer K, Tian Y, Graf R, Clavien PA. Novel short-term hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) system prevents injury in rat liver graft from non-heart beating donor. *Ann Surg*. 2006;244(6): 968-976; discussion 976-967.

21. de Rougemont O, Breitenstein S, Leskosek B, et al. One hour hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) protects nonviable liver allografts donated after cardiac death. *Ann Surg*. 2009;250(5): 674-683.

22. Kobayashi Y, Akamatsu Y, Iwane T, Nakamura A, Satomi S. Signaling pathway on the effect of oxygenated warm perfusion prior to cold preservation of the liver grafts from non-heart-beating donors, and the additive effect of edaravone. *Transplant Proc.* 2009;41(1): 49-51.
23. Hara Y, Akamatsu Y, Kobayashi Y, Iwane T, Satomi S. Perfusion using oxygenated buffer containing prostaglandin E1 before cold preservation prevents warm ischemia-reperfusion injury in liver grafts from non-heart-beating donors. *Transplant Proc.* 2010;42(10): 3973-3976.
24. Hara Y, Akamatsu Y, Maida K, et al. A new liver graft preparation method for uncontrolled non-heart-beating donors, combining short oxygenated warm perfusion and prostaglandin E1. *The Journal of surgical research.* 2013;184(2): 1134-1142.
25. Maida K, Akamatsu Y, Hara Y, et al. Short Oxygenated Warm Perfusion With Prostaglandin E1 Administration Before Cold Preservation as a Novel Resuscitation Method for Liver Grafts From Donors After Cardiac Death in a Rat In Vivo Model. *Transplantation.* 2016;100(5): 1052-1058.
26. Kakizaki Y, Miyagi S, Shimizu K, et al. Effects of Subnormothermic Perfusion Before Transplantation for Liver Grafts from Donation After Cardiac Death: A Simplified Dripping Perfusion Method in Pigs. *Transplant Proc.* 2018;50(5): 1538-1543.
27. Miyagi S, Iwane T, Akamatsu Y, Nakamura A, Sato A, Satomi S. The significance of preserving the energy status and microcirculation in liver grafts from non-heart-beating donor. *Cell Transplant.* 2008;17(1-2): 173-178.

28. Iwane T, Akamatsu Y, Narita T, Nakamura A, Satomi S. The effect of perfusion prior to cold preservation and addition of biliverdin on the liver graft from non-heart-beating donors. *Transplant Proc.* 2006;38(10): 3358-3361.
29. Nakamura A, Akamatsu Y, Miyagi S, Fukumori T, Sekiguchi S, Satomi S. A free radical scavenger, edaravone, prevents ischemia-reperfusion injury in liver grafts from non-heart-beating donors. *Transplant Proc.* 2008;40(7): 2171-2174.
30. Miyazawa K, Miyagi S, Maida K, et al. Edaravone, a free radical scavenger, improves the graft viability on liver transplantation from non-heart-beating donors in pigs. *Transplant Proc.* 2014;46(4): 1090-1094.
31. Wang W, Du Z, Yan J, et al. Mesenchymal stem cells promote liver regeneration and prolong survival in small-for-size liver grafts: involvement of C-Jun N-terminal kinase, cyclin D1, and NF- κ B. *PLoS One.* 2014;9(12):e112532.
32. Zhao W, Li JJ, Cao DY, et al. Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis. *World J Gastroenterol.* 2012;18(10):1048-1058.
33. Xia X, Chen W, Ma T, et al. Mesenchymal stem cells administered after liver transplantation prevent acute graft-versus-host disease in rats. *Liver Transpl.* 2012;18(6):696-706.
34. Tian Y, Wang J, Wang W, et al. Mesenchymal stem cells improve mouse non-heart-beating liver graft survival by inhibiting Kupffer cell apoptosis via TLR4-ERK1/2-Fas/FasL-caspase3 pathway regulation. *Stem Cell Res and Ther.* 2016;7(1):157.

35. Shi Y, Hu G, Su J, et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res*. 2010;20(5):510-518.
36. Pileggi A. Mesenchymal stem cells for the treatment of diabetes. *Diabetes*. 2012;61(16):1355-1356.
37. Papadopoulou A, Yiangou M, Athanasiou E, et al. Mesenchymal stem cells are conditionally therapeutic in preclinical models of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(10):1733-1740.
38. Aquino JB, Bolontrade MF, Garcia MG, et al. Mesenchymal stem cells as therapeutic tools and gene carriers in liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Gene Ther*. 2010;17(6):692-708.
39. Li J, Zhang L, Xin J, et al. Immediate intraportal transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cells prevents death from fulminant hepatic failure in pigs. *Hepatology*. 2012;56(3):1044-1052.
40. Rowart P, Erplcum P, Ddtry O, et al. Mesenchymal stromal cell therapy in ischemia/reperfusion injury. *J Immonol Res*, 2015:602597.
41. Souidi N, Stolk M, Seifert M, Ischemia-reperfusion injury: beneficial effects of mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Organ Tranplant*, 2013;18(1):34-43.
42. Caplan AI, Dennis JE, Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006;98(5):1076-1084.

43. Du Z, Wei C, Cheng K, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium reduces liver injury and enhances regeneration in reduced-size rat liver transplantation. *J Surg Res.* 2013;183(2):907-915.
44. English K, Wood KJ, Mesenchymal stem cells in transplantation rejection and tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(5):a015560.
45. Sang JF, Shi XL, Han B, et al. Intraportal mesenchymal stem cell transplantation prevents acute liver failure through promoting cell proliferation and inhibiting apoptosis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2016;15(6):602-611.
46. Kanazawa H, Fujimoto T, Teratani T, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia reperfusion injury in a rat model. *PLoS One.* 2011;6(4):e19195.
47. Cao H, Yang J, Yu J, et al. Therapeutic potential of transplanted placental mesenchymal stem cells in treating Chinese miniature pigs with acute liver failure. *BMC Med.* 2012;10:56.
48. Dahlke MH, Hoogduijn M, Eggenhofer E, et al. Toward MSC in solid organ transplantation: 2008 position paper of the MISOT study group. *Transplantation.* 2009;88(5):614-619.
49. Zhang S, Bai C, Zheng D, et al. Identification and characterization of pig adipose-derived progenitor cells. *Can J Vet Res.* 2016;80(4):309-317.
50. Bessems M, 't Hart NA, Tolba R, et al. The isolated perfused rat liver: standardization of a time-honoured model. *Lab Anim.* 2006;40(3):236-246.
51. Monbaliu D, Crabbe T, Roskams T, Fevery J, Verwaest C, Pirenne J. Livers from non-heart-

beating donors tolerate short periods of warm ischemia. *Transplantation*. 2005;79(9): 1226-1230.

52. Takada Y, Taniguchi H, Fukunaga K, et al. Hepatic allograft procurement from non-heart-beating donors: limits of warm ischemia in porcine liver transplantation. *Transplantation*. 1997;63(3): 369-373.

53. Miyagi S, Okada A, Kawagishi N, Fujimori K, Satomi S. The new strategy of liver transplantation from marginal donors using serine protease inhibitor. *Transplant Proc*. 2009;41(1): 36-39.

54. Bernat JL, D'Alessandro AM, Port FK, et al. Report of a National Conference on Donation after cardiac death. *Am J Transplant*. 2006;6(2): 281-291.

55. Ferrigno A, Rizzo V, Boncompagni E, et al. Machine perfusion at 20 degrees C reduces preservation damage to livers from non-heart beating donors. *Cryobiology*. 2011;62(2):152-158.

56. Mickelson JK, Kukiela G, Bravenec JS, et al. Differential expression and release of CD54 induced by cytokines. *Hepatology*. 1995;22(3): 866-875.

57. Jaeschke H, Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol*. 1997;61(6): 647-653.

58. Jaeschke H. Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(6): G1083-1088.

59. Seya K, Ohkohchi N, Mori S. Changes in the ability of ATP synthesis in the mitochondrial membrane in the rat liver injured by carbon tetrachloride. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 1996;178(4): 425-430.
60. Seya K, Ohkohchi N, Watanabe N, Shibuya H, Taguchi Y, Mori S. Rapid fluorometric assay for mitochondrial proton adenosine triphosphatase activity for assessment of viability of liver graft tissue. *J Clin Lab Anal*. 1994;8(6): 418-423.
61. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology*. 1992;119(3): 493-501.
62. Gorczyca W, Bruno S, Darzynkiewicz R, Gong J, Darzynkiewicz Z. DNA strand breaks occurring during apoptosis - their early insitu detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. *International journal of oncology*. 1992;1(6): 639-648.
63. Flye MW, Pennington L, Kirkman R, Weber B, Sindelar W, Sachs DH. Spontaneous acceptance or rejection of orthotopic liver transplants in outbred and partially inbred miniature swine. *Transplantation*. 1999;68(5): 599-607.
64. Calne R. Immunological tolerance: the liver effect. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002;17 Suppl: S488-490.
65. Calne RY, White HJ, Yoffa DE, et al. Observations of orthotopic liver transplantation in the

pig. *Br Med J*. 1967;2(5550): 478-480.

66. Jahr H, Wolff H. [The liver--an immunologically privileged organ?]. *Allerg Immunol (Leipz)*.

1989;35(3): 155-166.

67. Starzl TE. The "privileged" liver and hepatic tolerogenicity. *Liver Transpl*. 2001;7(10): 918-

920.

68. Zhang Y, Ohkohchi N, Oikawa K, Sasaki K, Satomi S. Assessment of viability of the liver graft in different cardiac arrest models. *Transplant Proc*. 2000;32(7): 2345-2347.

69. Yu Y, Lu L, Qian X, et al. Antifibrotic effect of hepatocyte growth factor expressing mesenchymal stem cells in small-for-size liver transplant rats. *Stem Cells Dev*. 2010;19(6):903-

914.

70. Cui L, Meng Q, Wen J, et al. A Functional Comparison of Treatment of Intrinsic Sphincter Deficiency with Muscle-Derived and Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *IUBMB Life*.

2018;70:976-984.

71. Kazama T, Basic Research and Clinical Application in Mesenchymal Stem Cells. *J.Nihon*

Univ. Med. Ass. 2016;75(2):61-66.

図

図1 温阻血再灌流障害イメージ

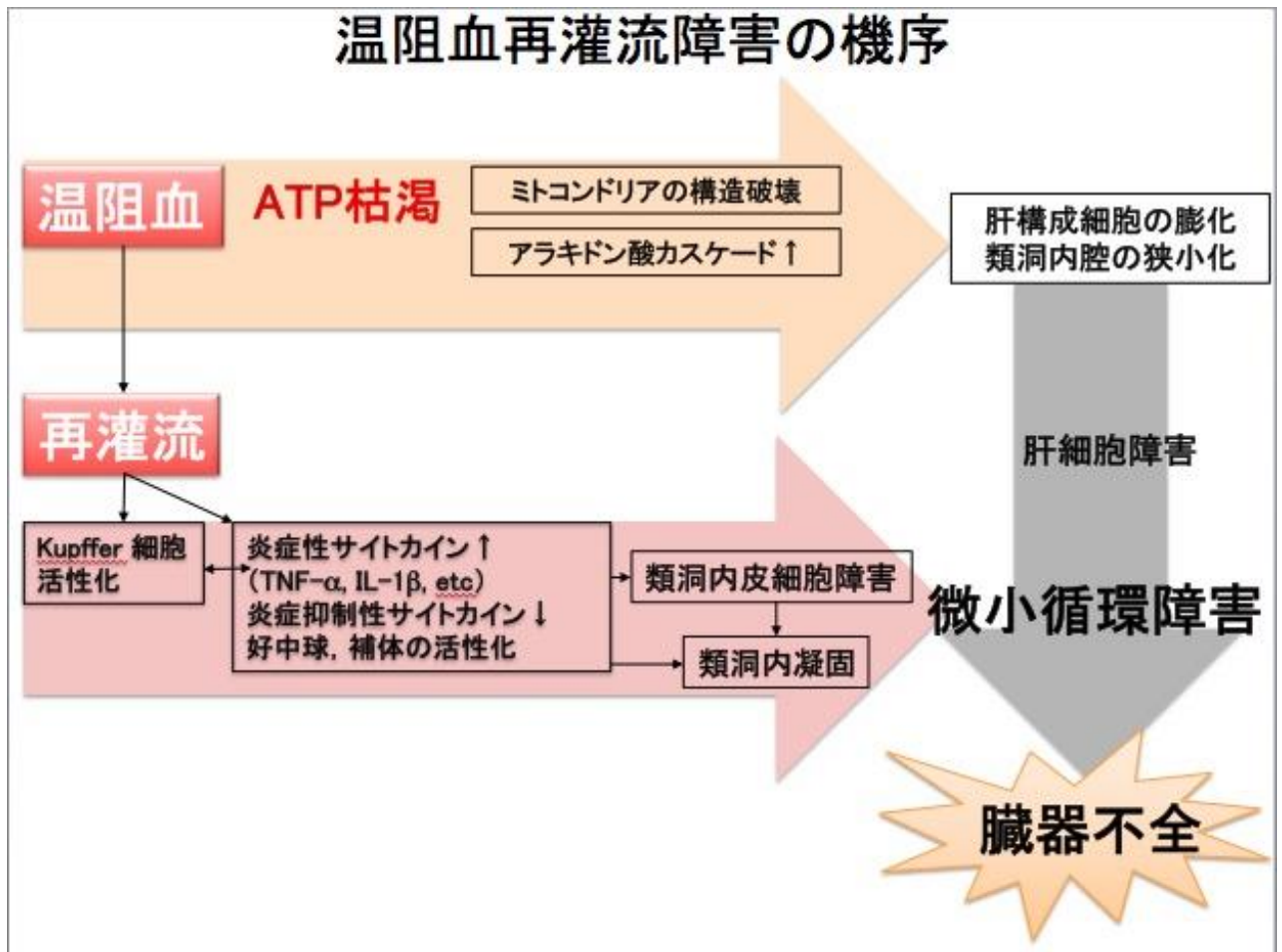


図2 ADSC 顕微鏡写真 (×200)

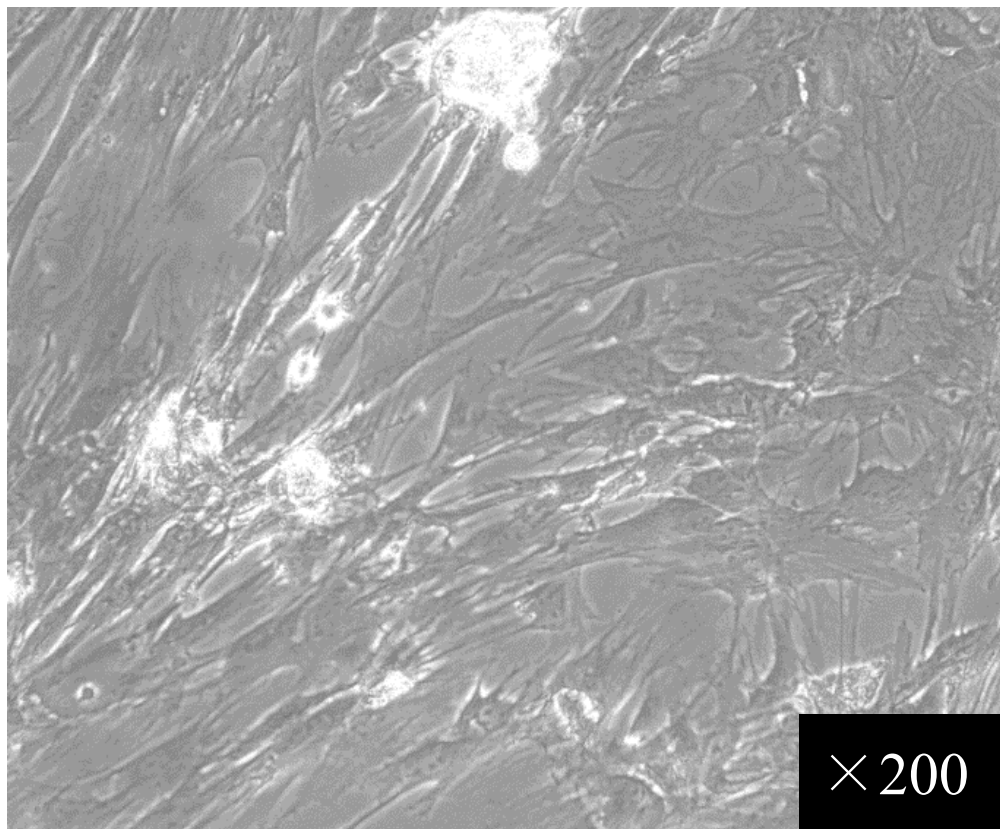


図3 実験Ⅱ（ラット肝灌流実験） プロトコール

1) 心拍動ドナー群（Heart-beating群; HB群） n=5



2) 心停止ドナー群（Donor after cardiac death群; DCD群） n=5



3) ADSC投与群（ADSC-1, -2群） n=5

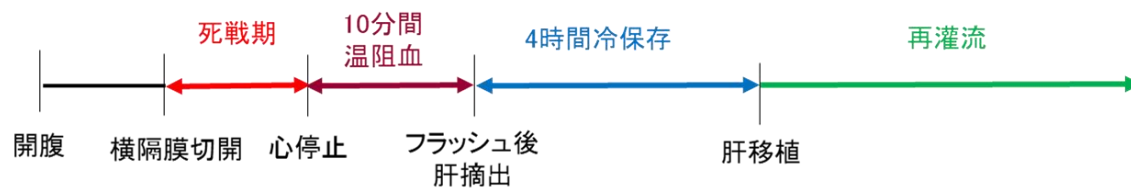


図4 実験Ⅲ（ブタ肝移植実験）プロトコール

1)心拍動ドナー群(Heart-beating群;HB群) n=5



2)心停止ドナー群(Donor after cardiac death群;DCD群) n=5



3)ADSC投与群 (ADSC群) n=5

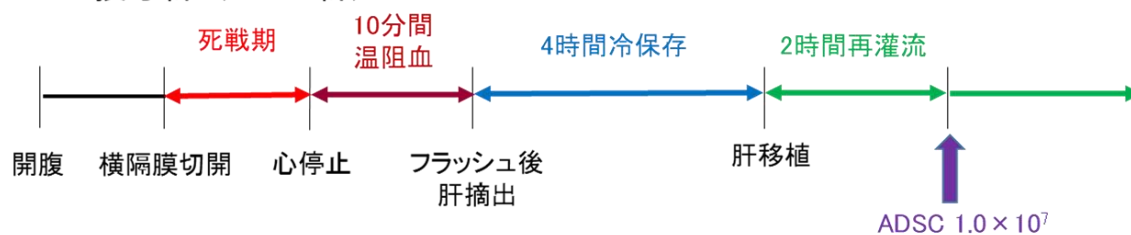
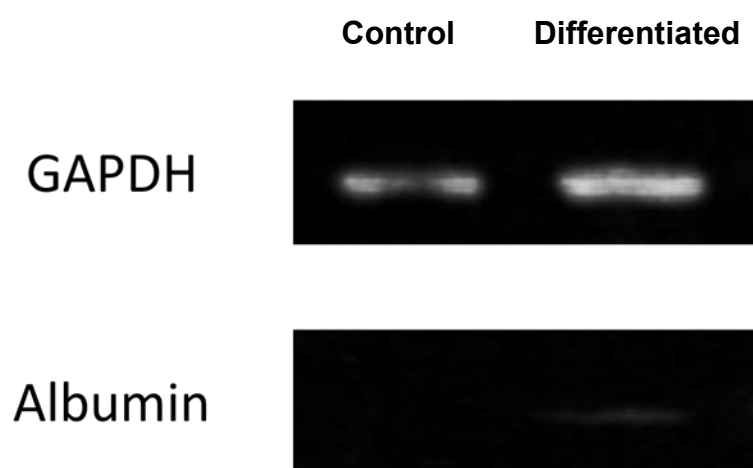
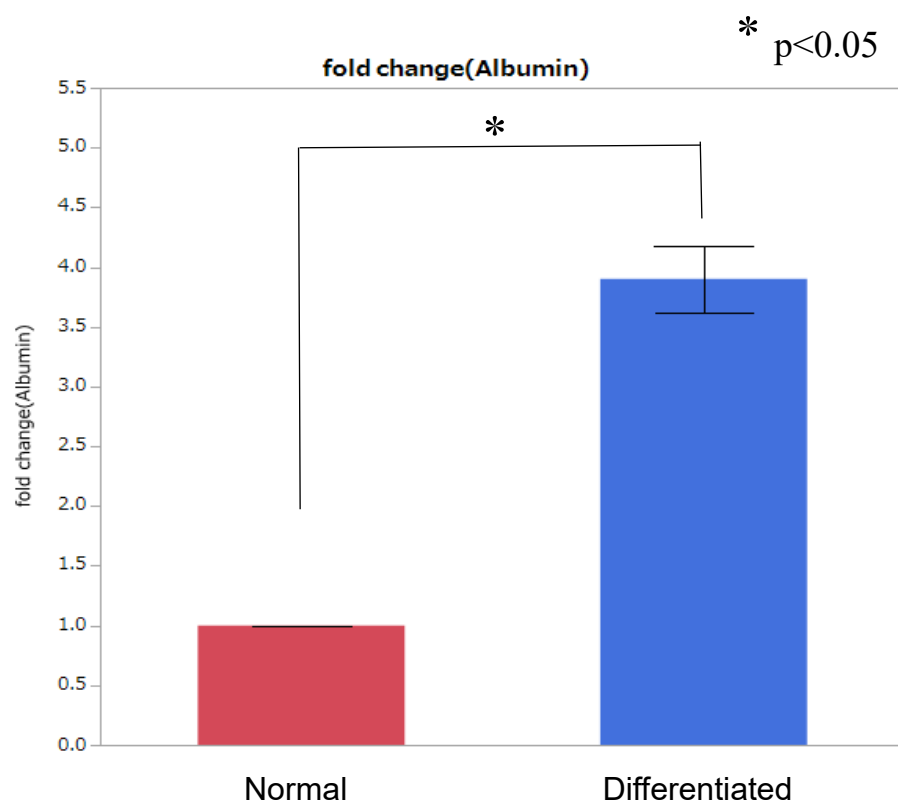


図5 実験 I (A) PCR (B) qPCR

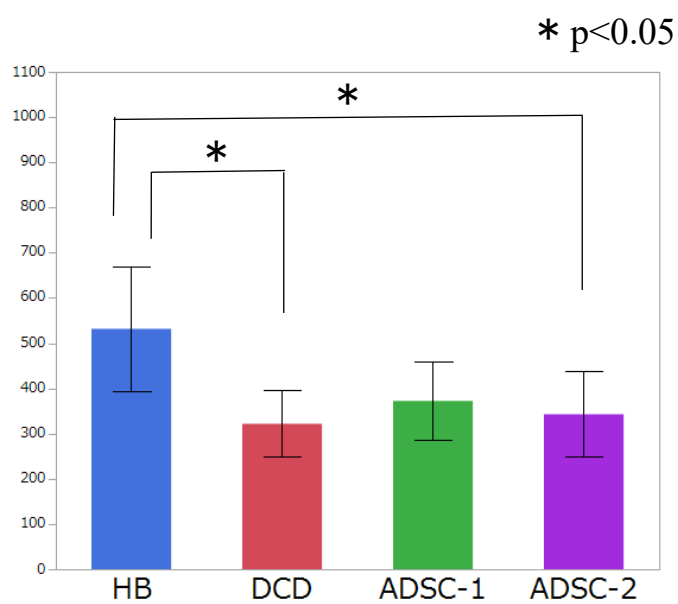


(A)

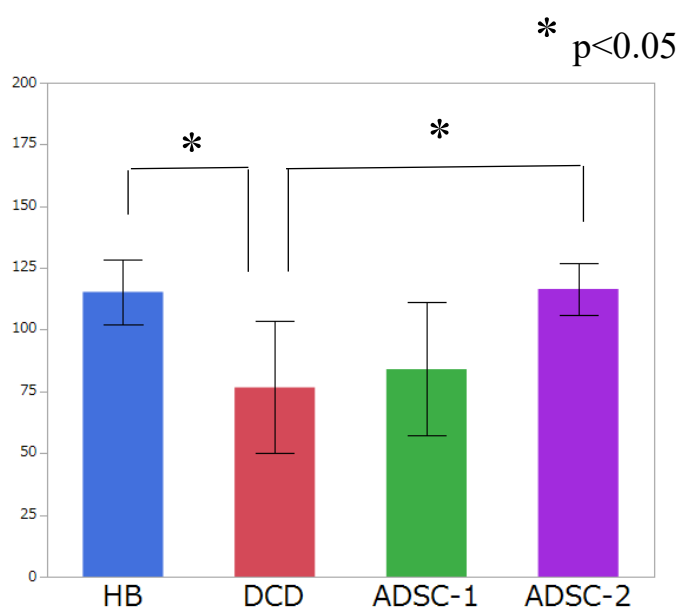


(B)

図6 実験Ⅱ(ラット) 門脈灌流液量 (ml/g liver) (A) 胆汁産生量 (μl/g liver) (B)

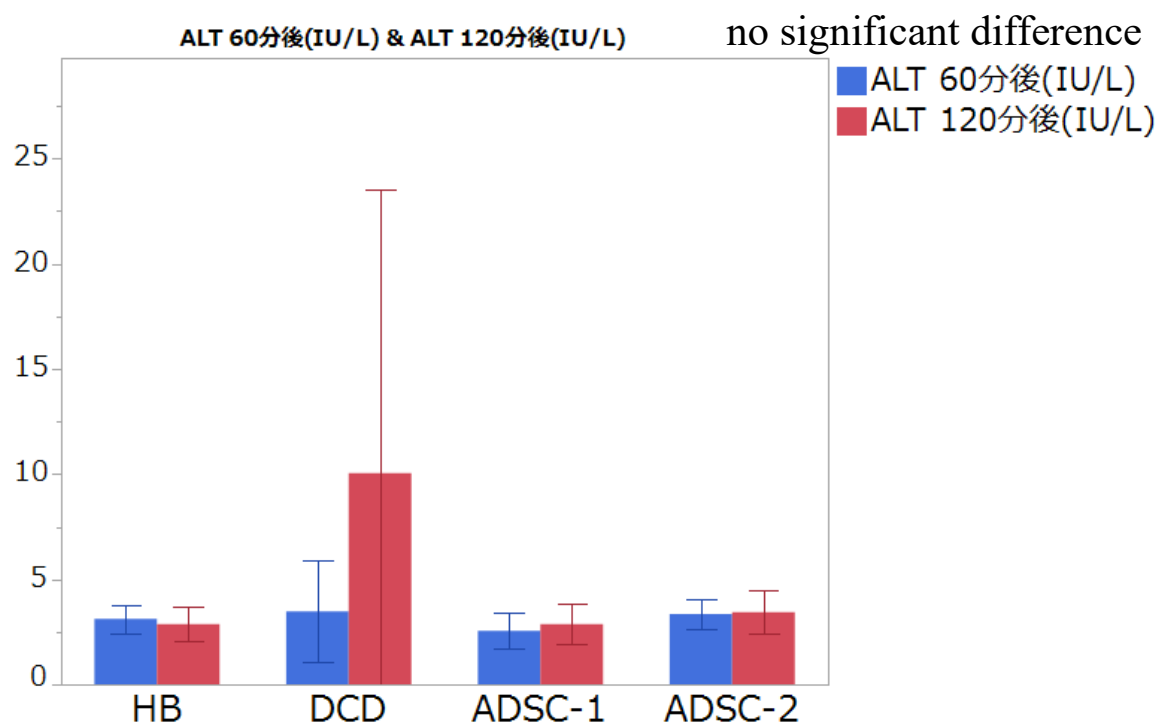
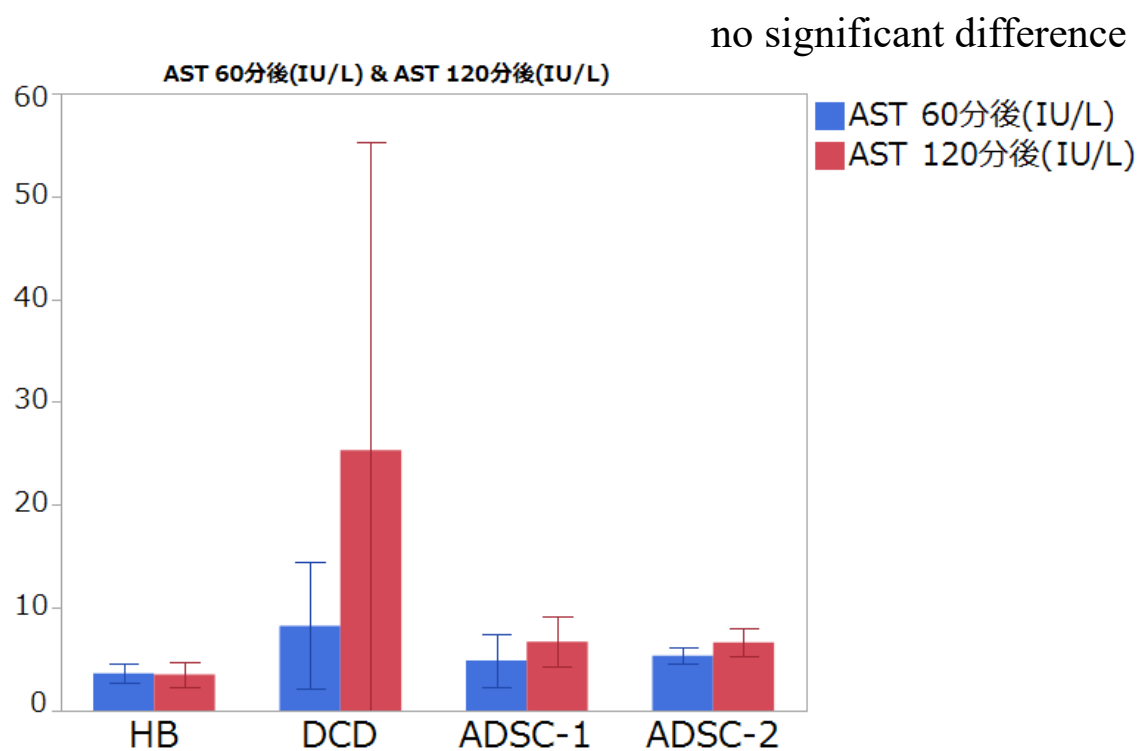


(A)



(B)

図7 実験Ⅱ（ラット）再灌流後の灌流液中肝逸脱酵素



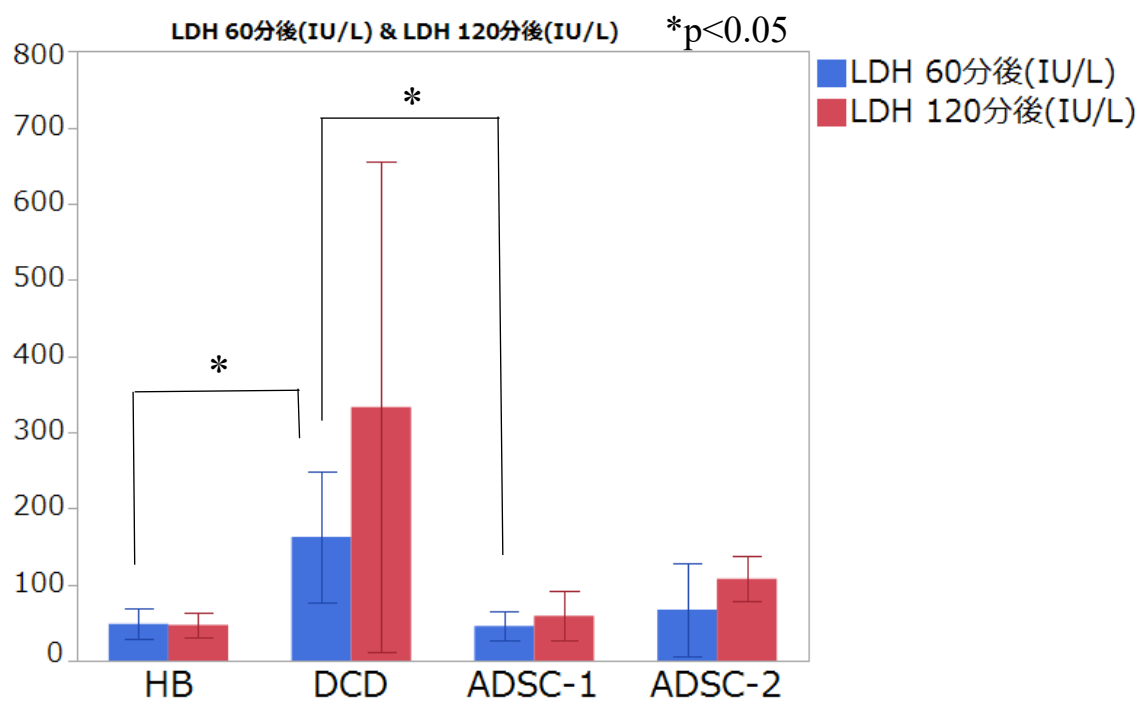


図 8 実験 II (ラット) 再灌流後の灌流液中炎症性サイトカイン

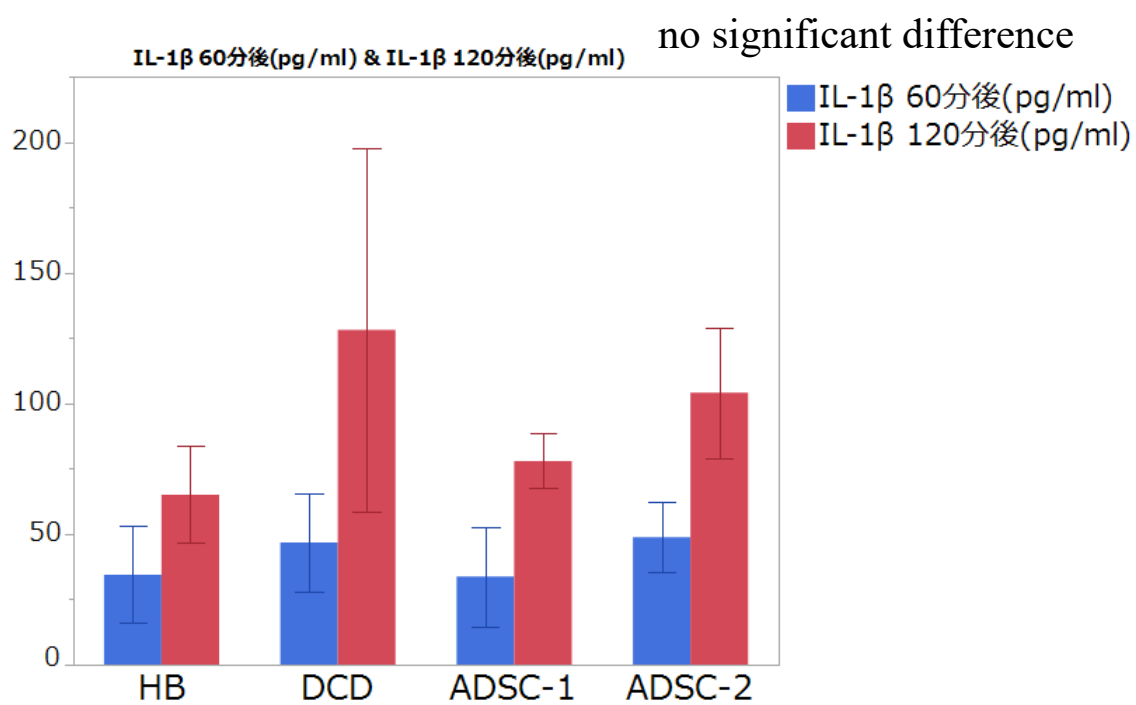
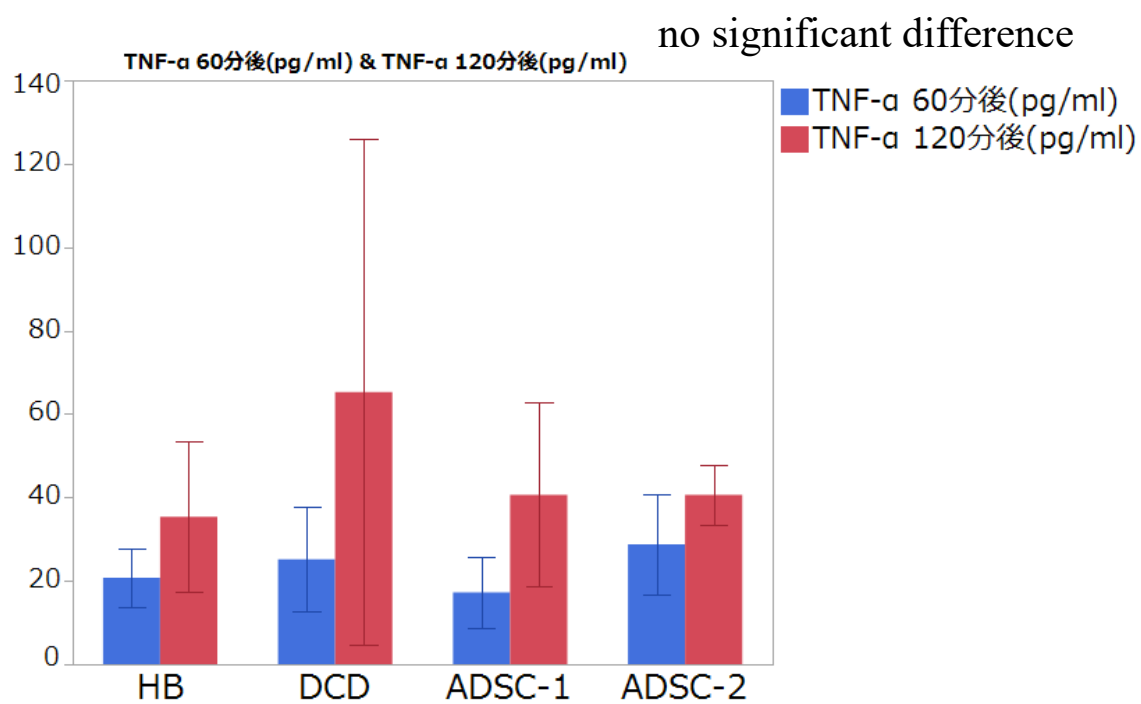


図 9 実験Ⅱ（ラット）再灌流後の灌流液中可溶性 ICAM-1

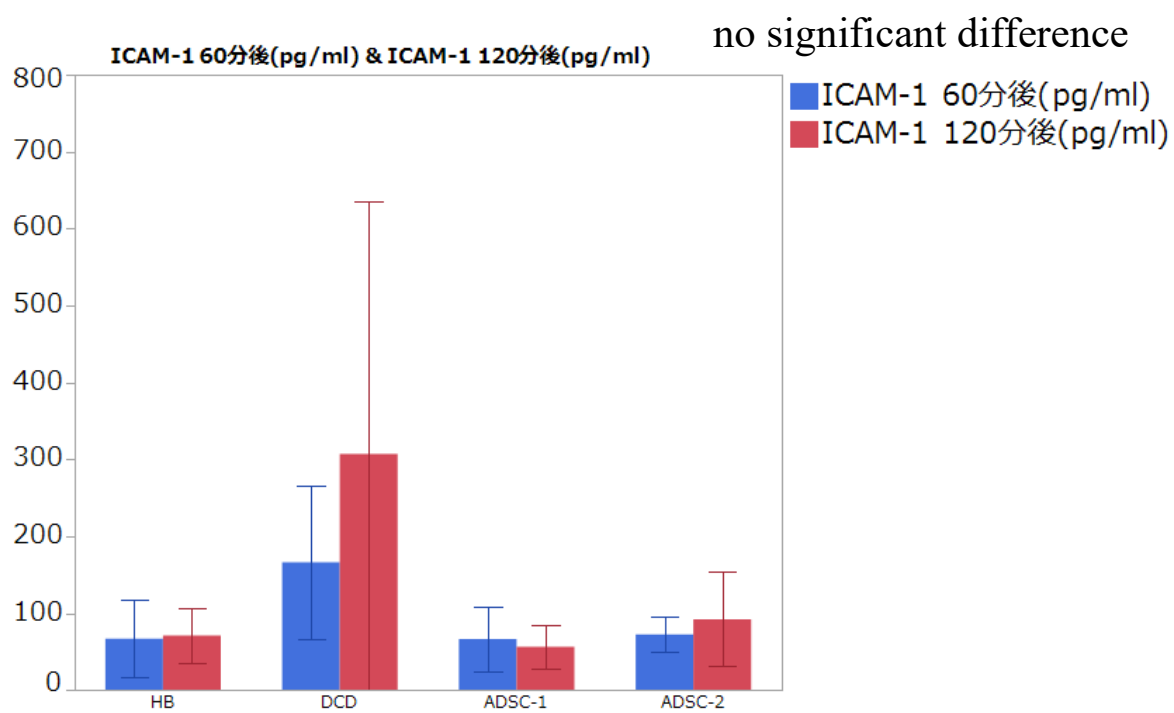


図 10 実験Ⅱ（ラット）肝組織中 ADP/ATP 比

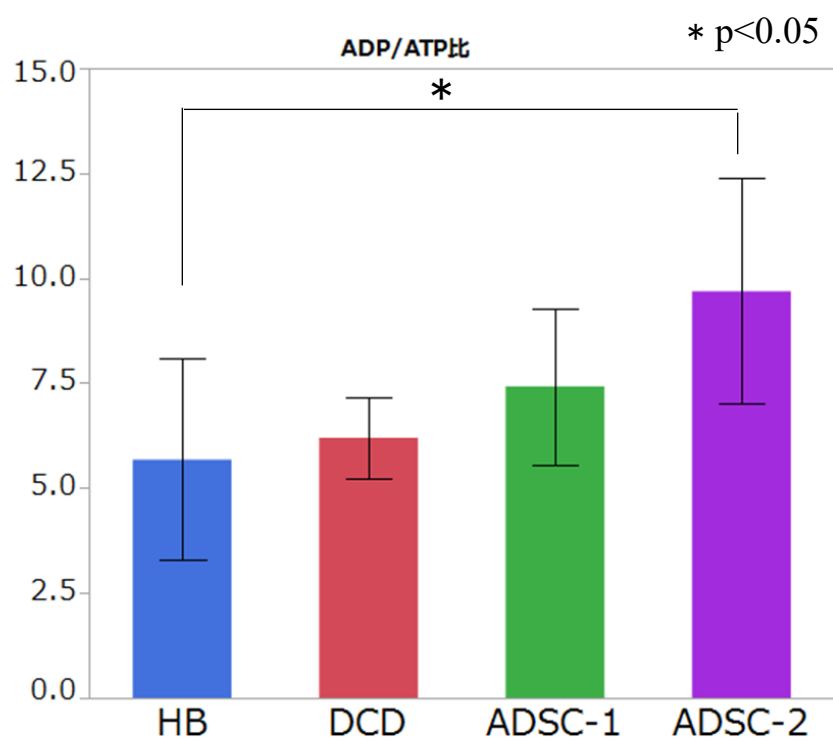


図 11 実験Ⅱ（ラット）再灌流後の肝組織 HE 染色所見 （×200）

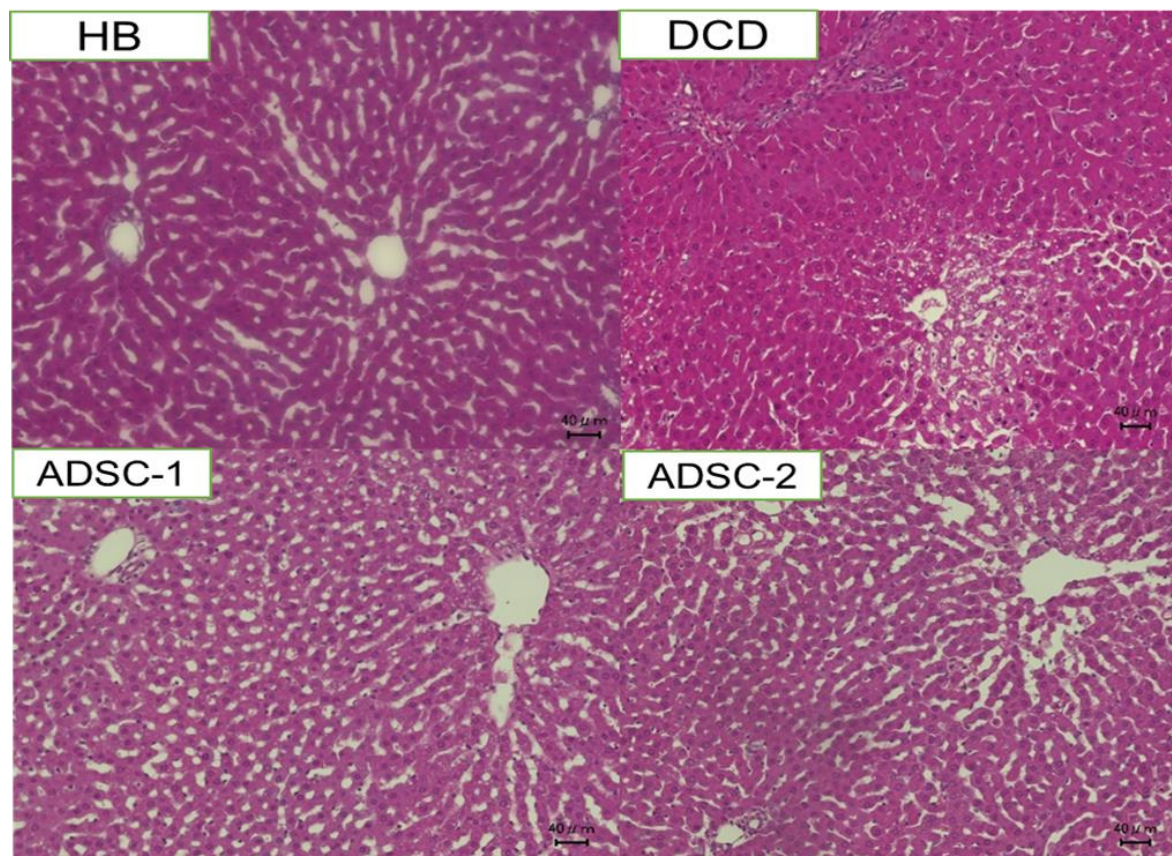


図 12 実験Ⅱ（ラット）門脈開存率（%）

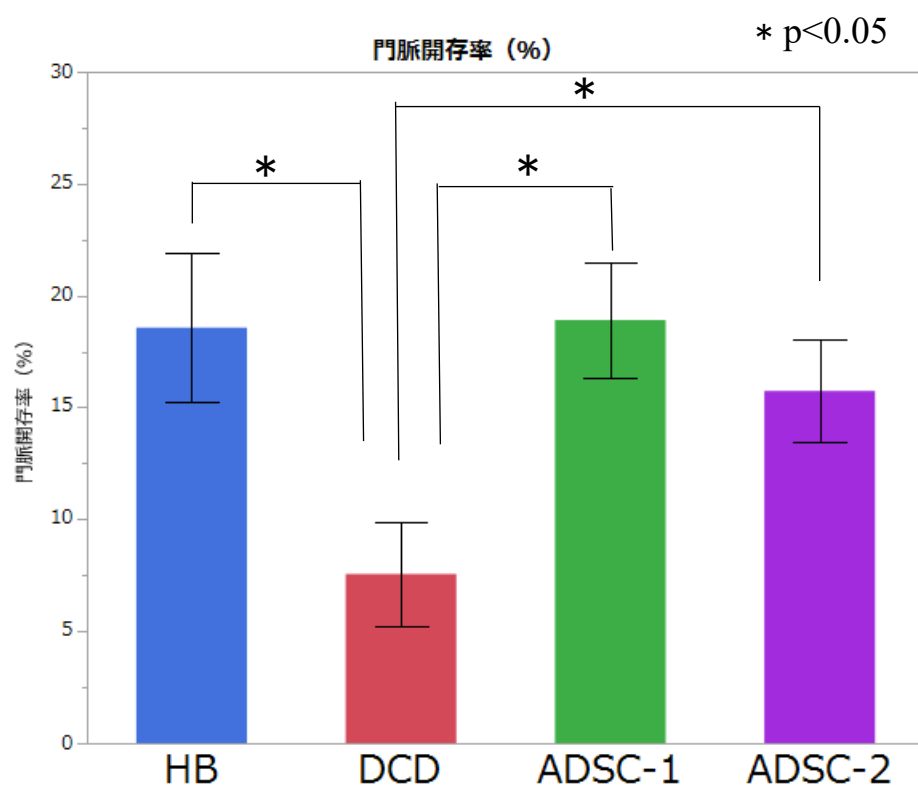


図 13 実験Ⅱ（ラット） 再灌流後の肝組織 TUNEL 染色所見 （×200）

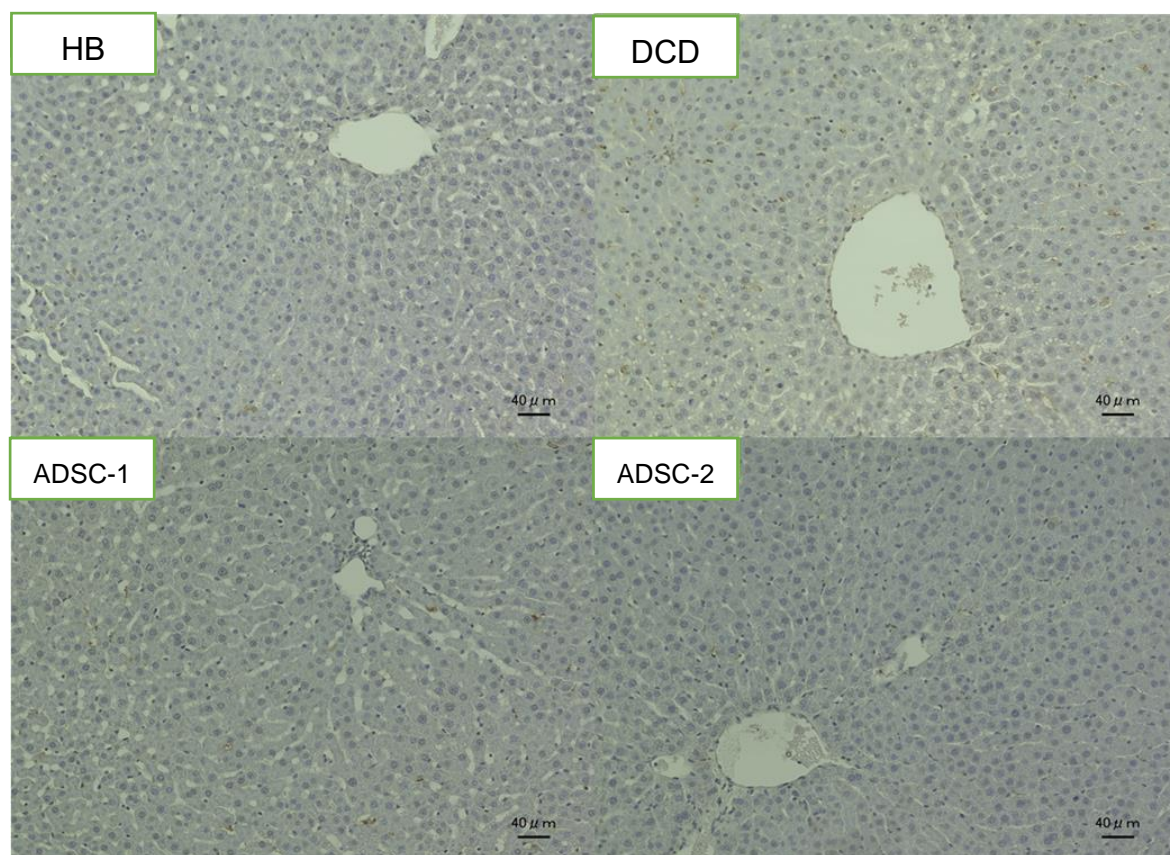


図 14 実験Ⅱ（ラット） 再灌流後の肝組織 TUNEL 陽性細胞数

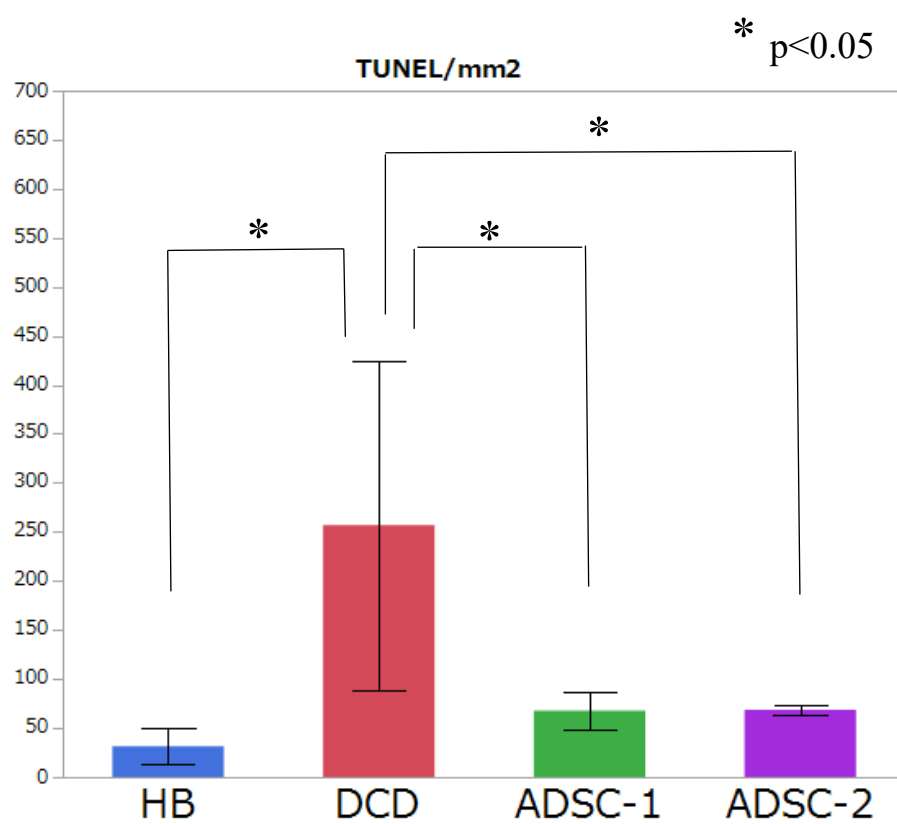
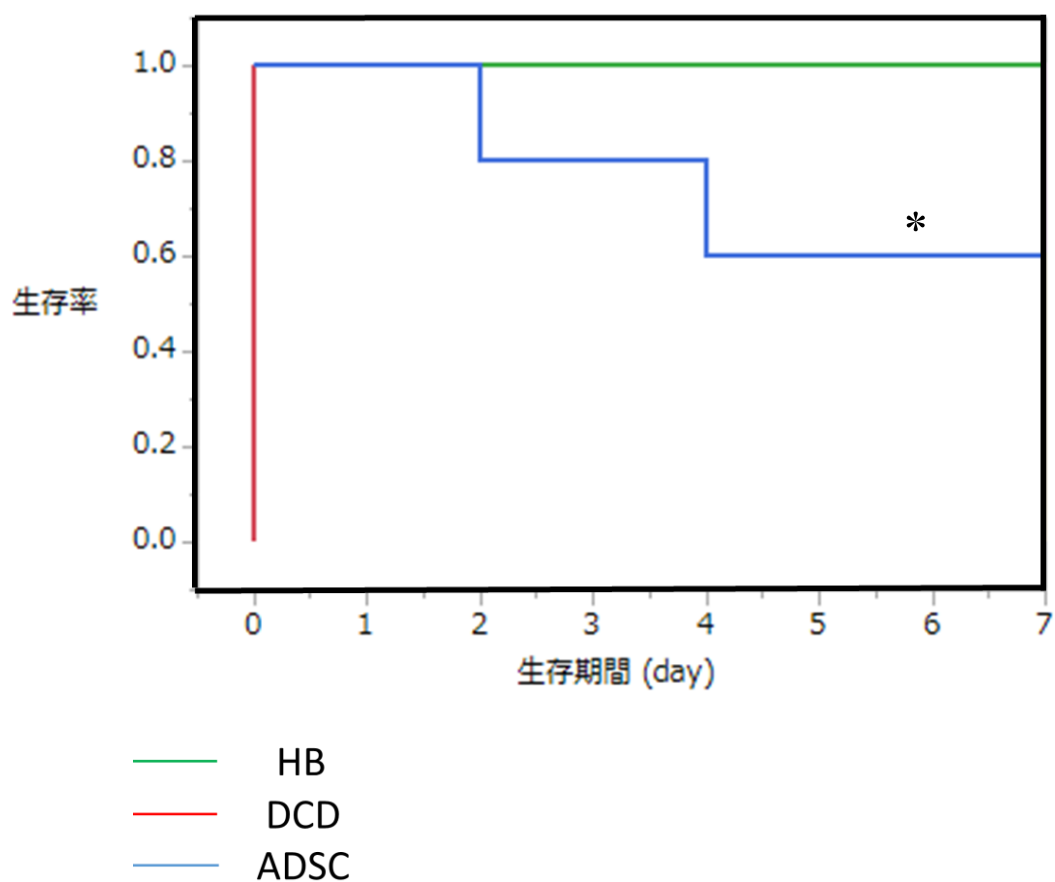


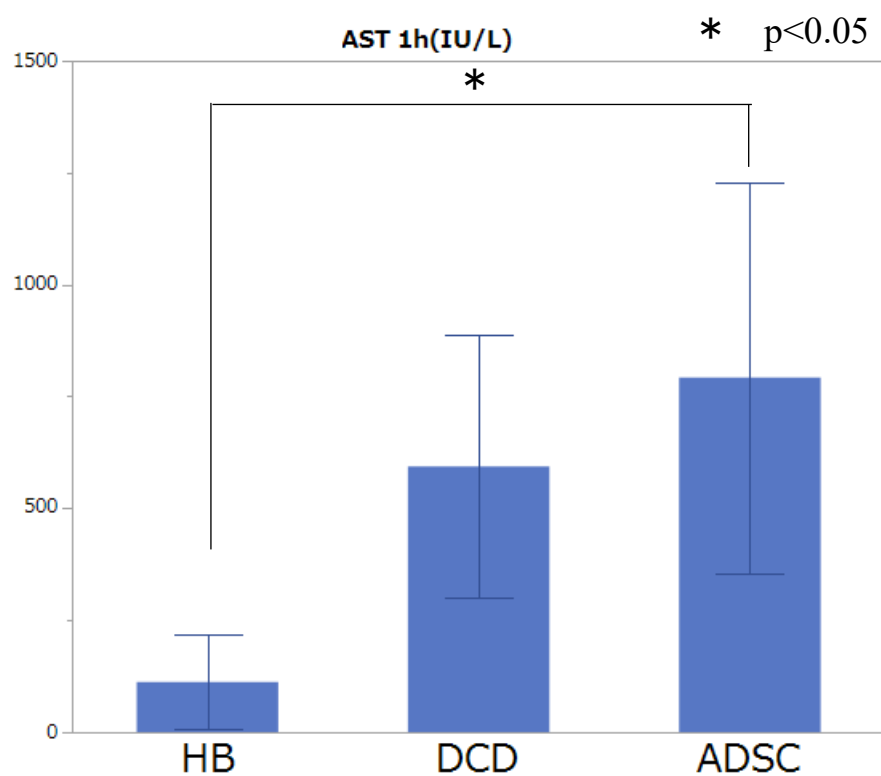
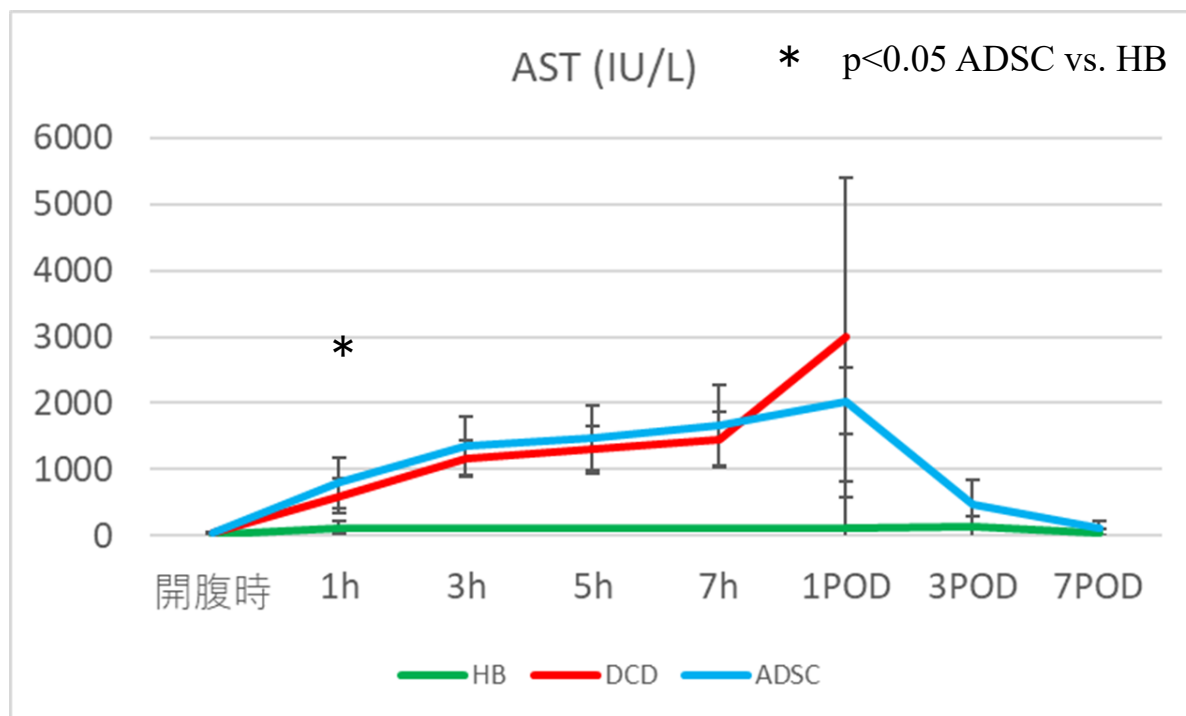
図 15 実験Ⅲ（ブタ） 全個体の生死 生存曲線

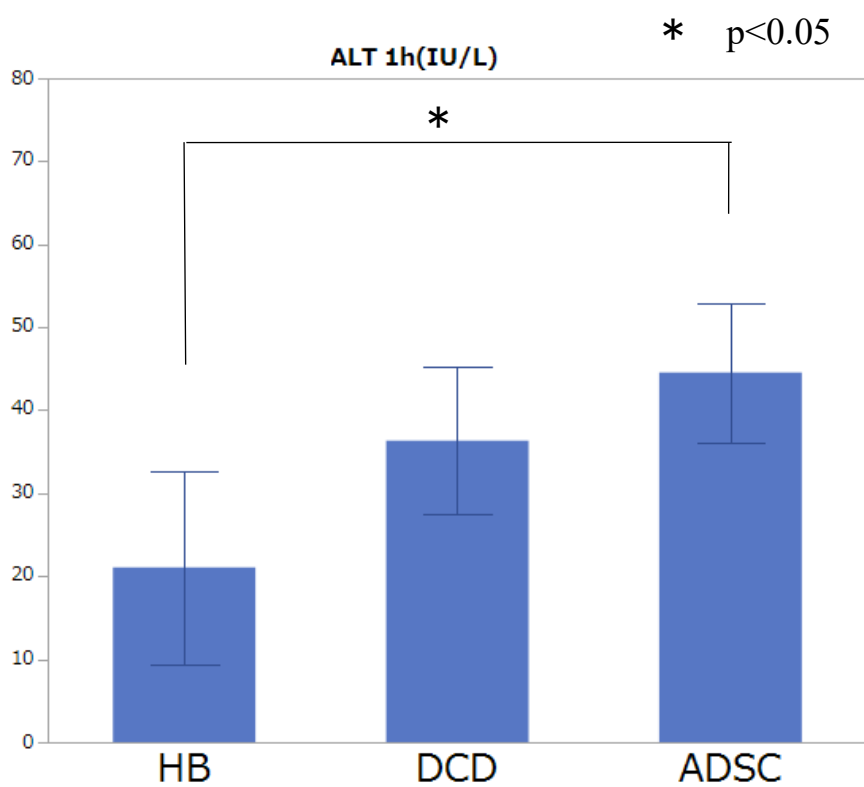
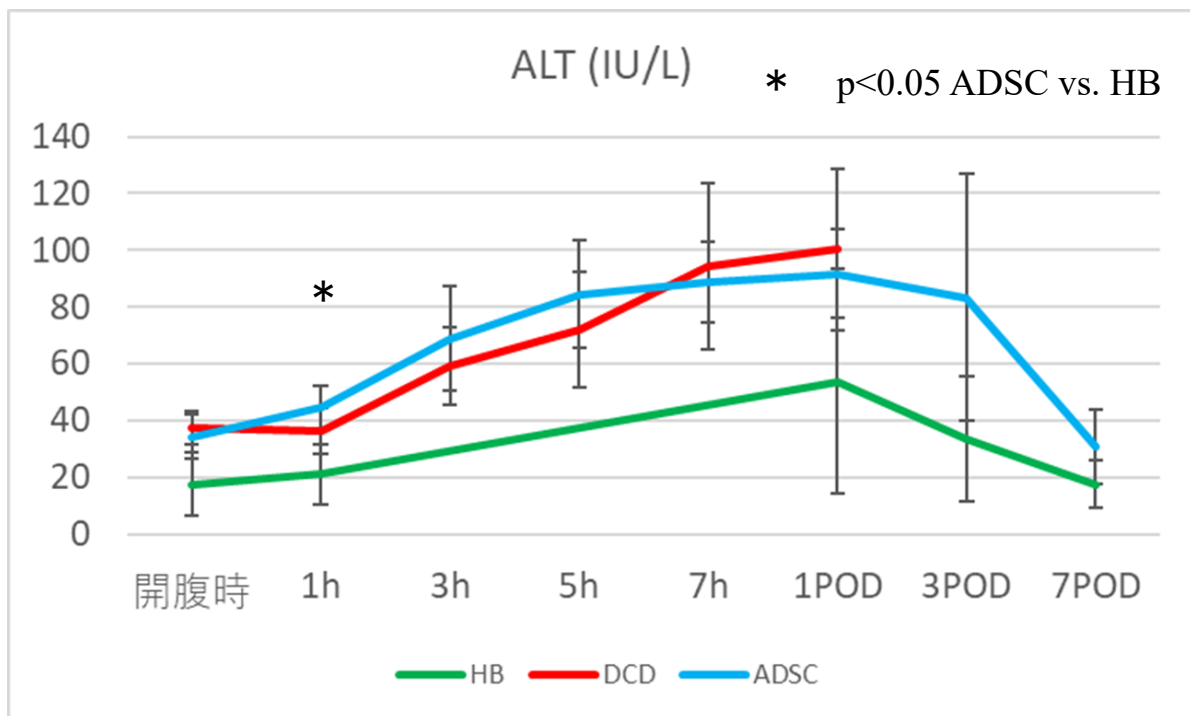
Group	Survival	Cause of Death
HB	> 7days	-----
HB	> 7days	-----
HB	> 7days	-----
HB	> 7days	-----
HB	> 7days	-----
DCD	< 24hours	Primary graft nonfunction
DCD	< 24hours	Primary graft nonfunction
DCD	< 24hours	Primary graft nonfunction
DCD	< 24hours	Primary graft nonfunction
DCD	< 24hours	Primary graft nonfunction
ADSC	> 7days	-----
ADSC	> 7days	-----
ADSC	> 7days	-----
ADSC	4 days (88 hours)	Primary graft nonfunction
ADSC	2 days (30 hours)	Primary graft nonfunction



* ADSC vs. DCD $p=0.0005$ Kaplan-meier longrank test

図 16 実験Ⅲ（ブタ） 血清中肝逸脱酵素





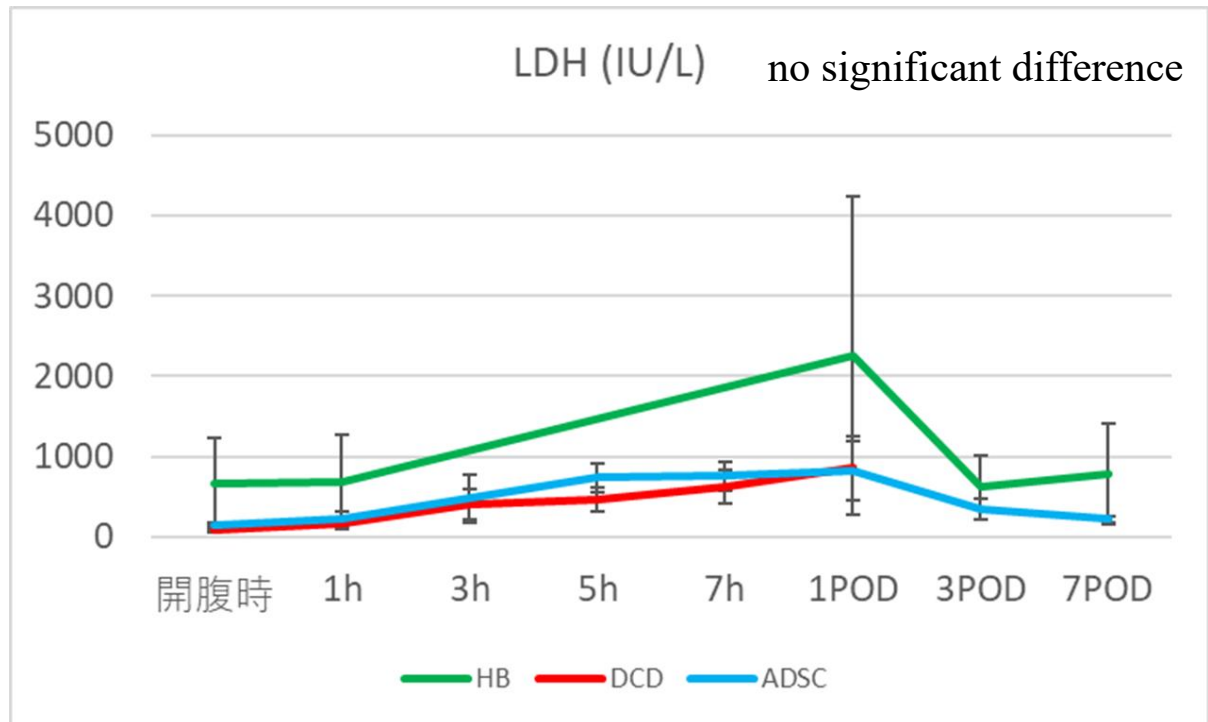
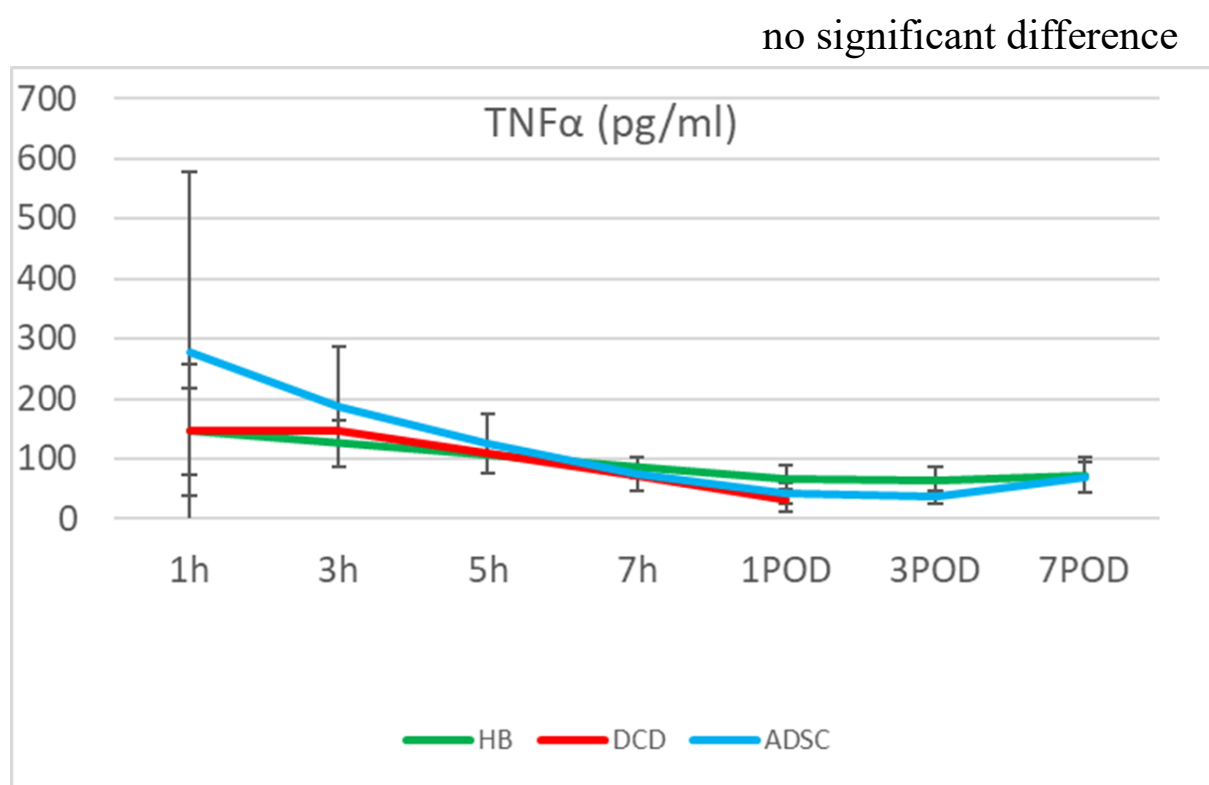
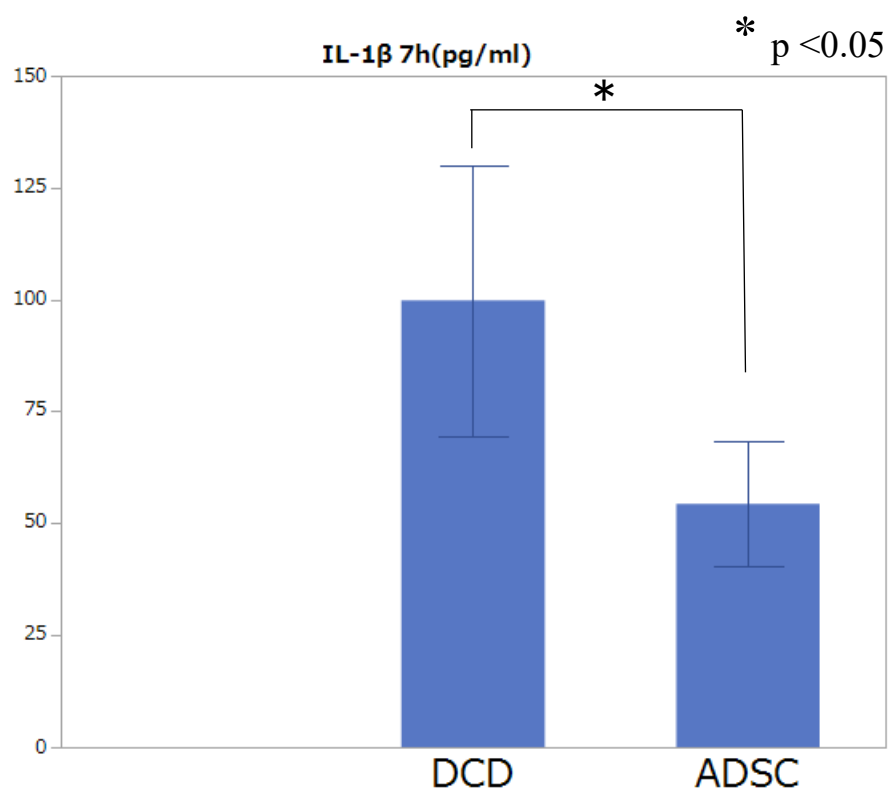
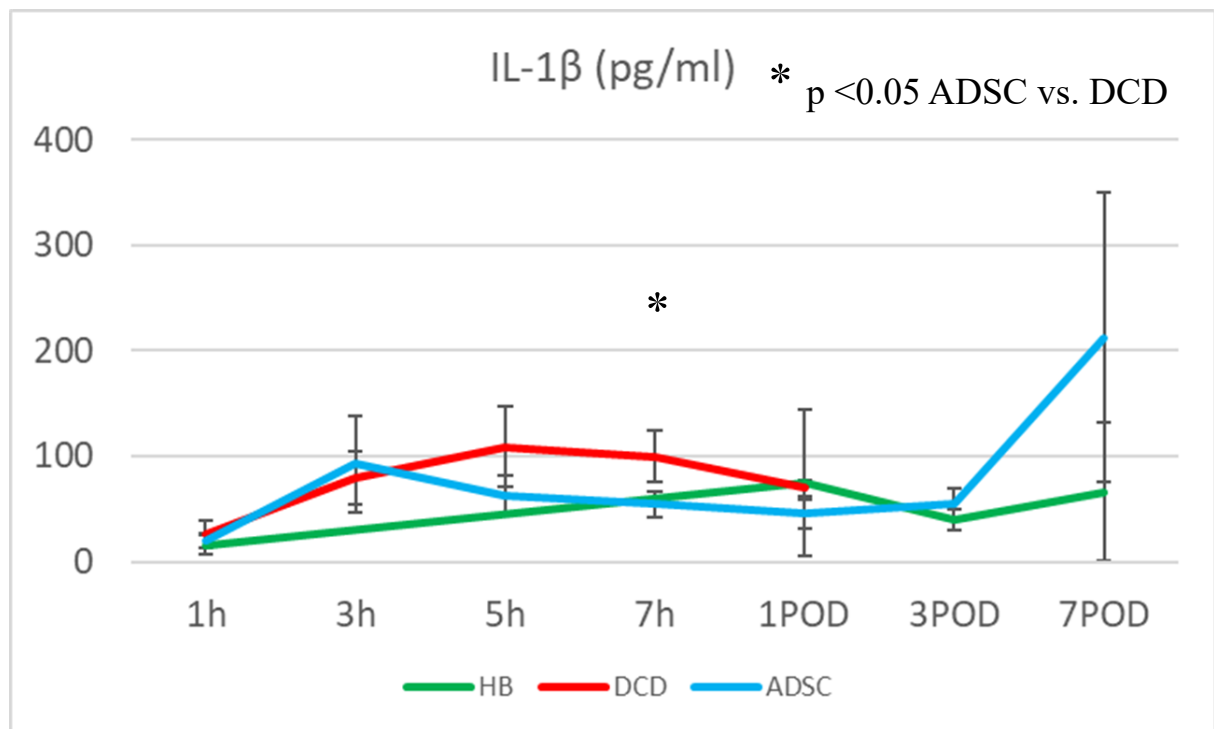
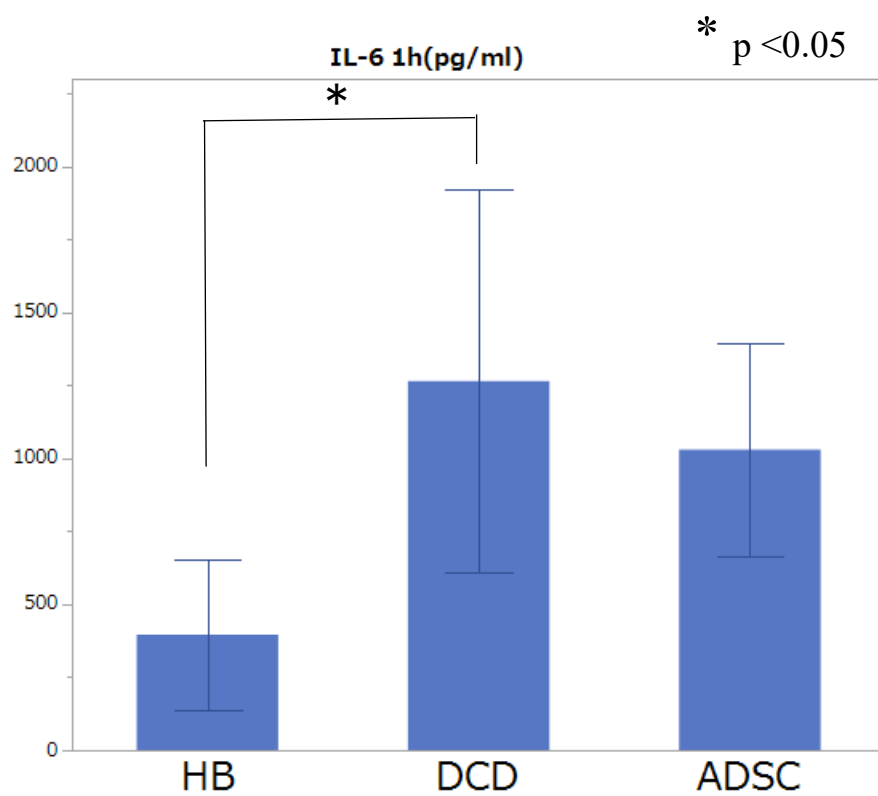
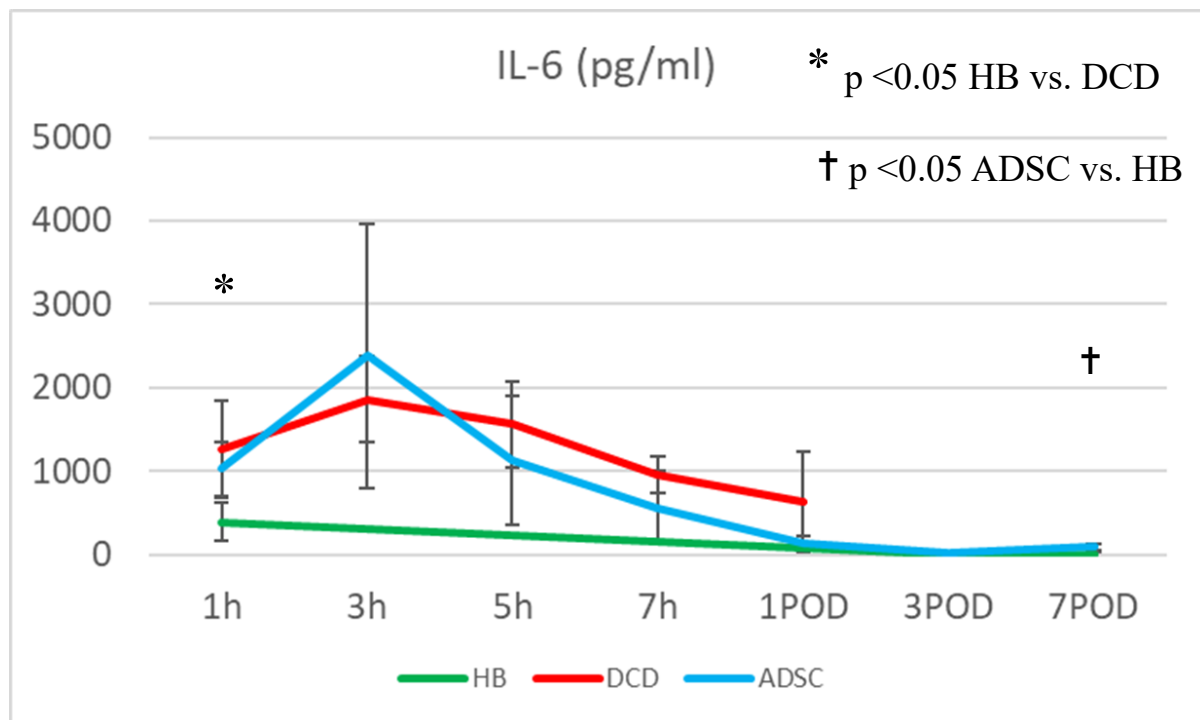


図 17 実験Ⅲ（ブタ）血清中炎症性サイトカイン







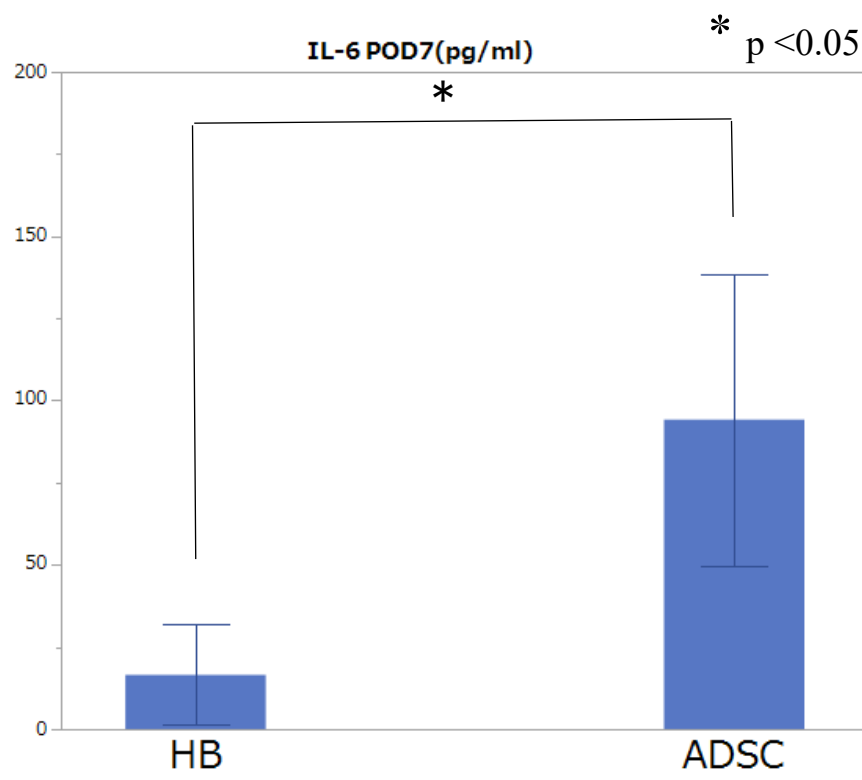


図 18 実験Ⅲ（ブタ） 犠牲死時の肝組織 HE 染色所見 （×200）

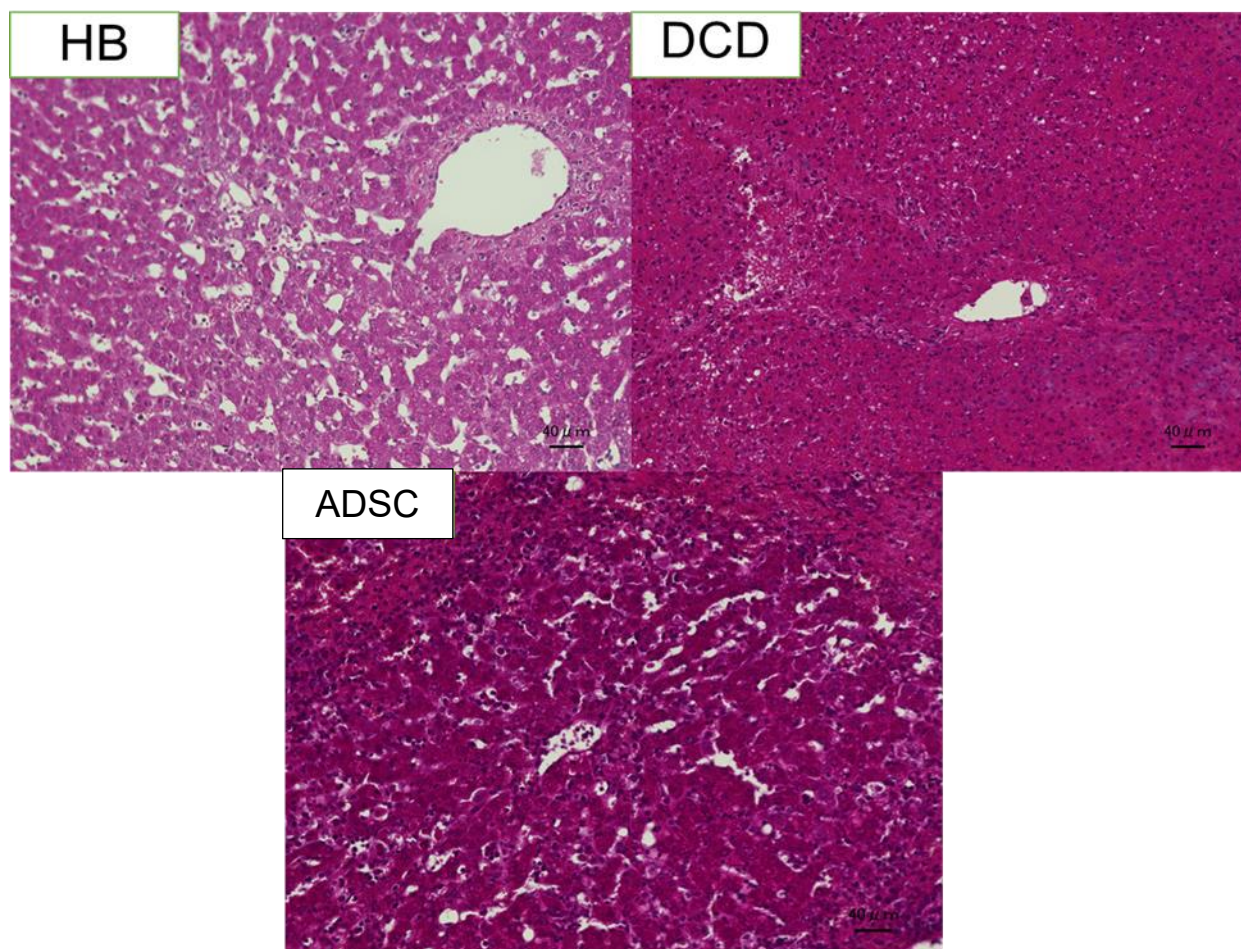


図 19 実験Ⅲ（ブタ） 犠牲死時の肝組織 TUNEL 染色所見 （×200）

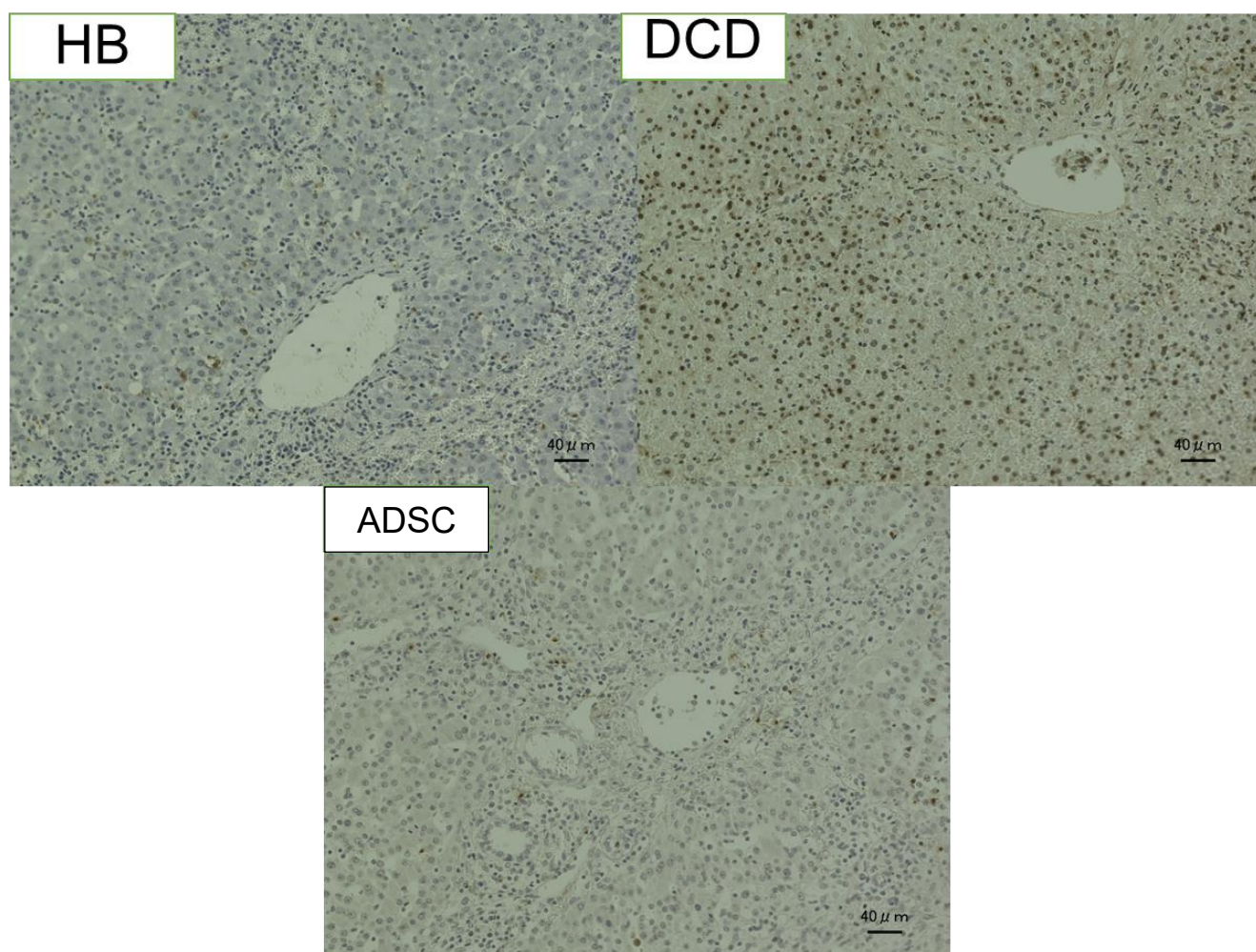


図 20 実験Ⅲ（ブタ）犠牲死時の肝組織 TUNEL 陽性細胞数

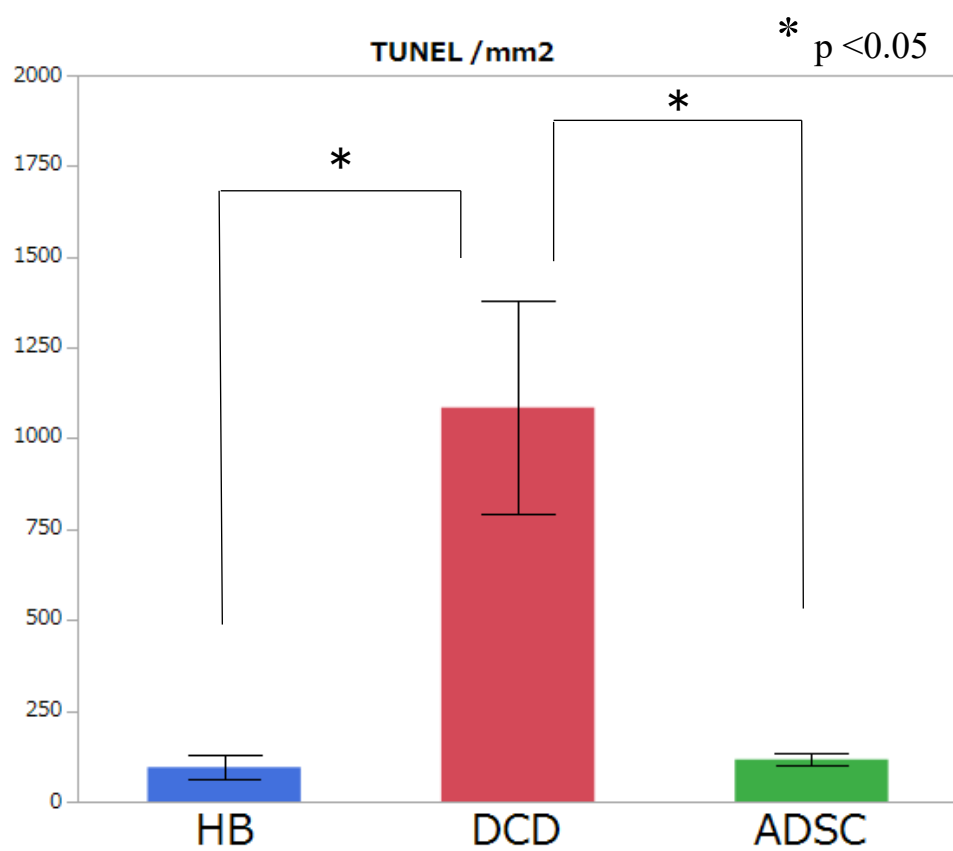
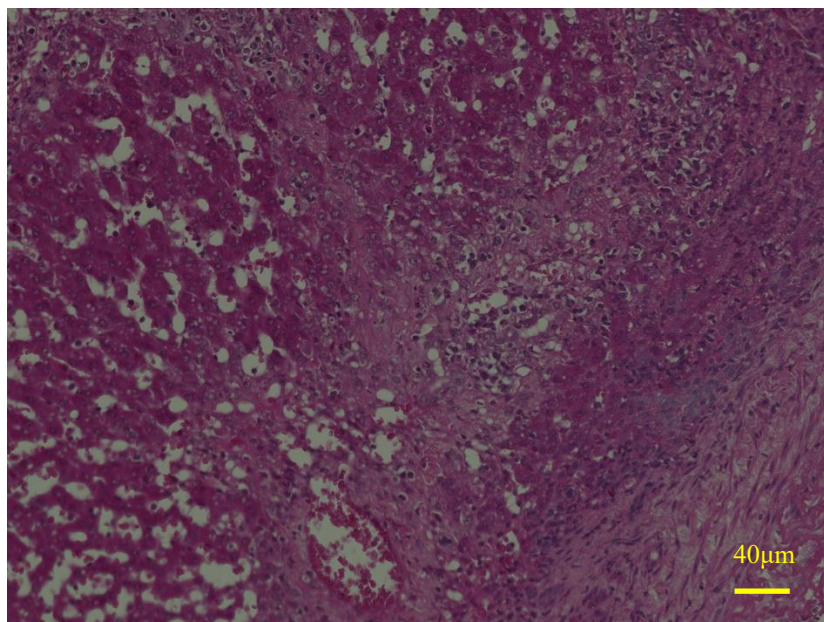


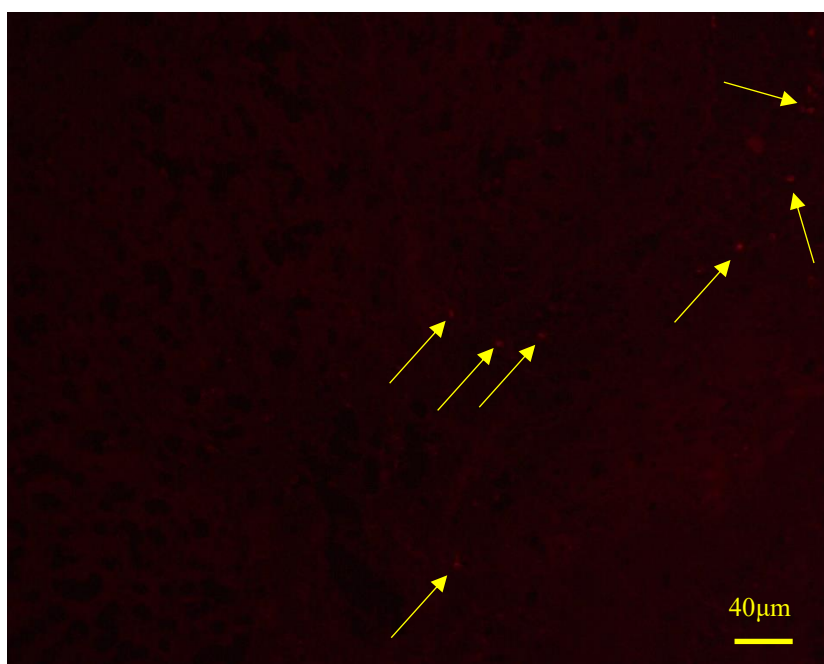
図 21 実験Ⅲ（ブタ） 犠牲死時の肝組織中 ADSC（CM-dil） （×200）

（A） ADSC 群

HE 染色所見



同部位の蛍光顕微鏡所見



(B) DCD 群 螢光顯微鏡所見

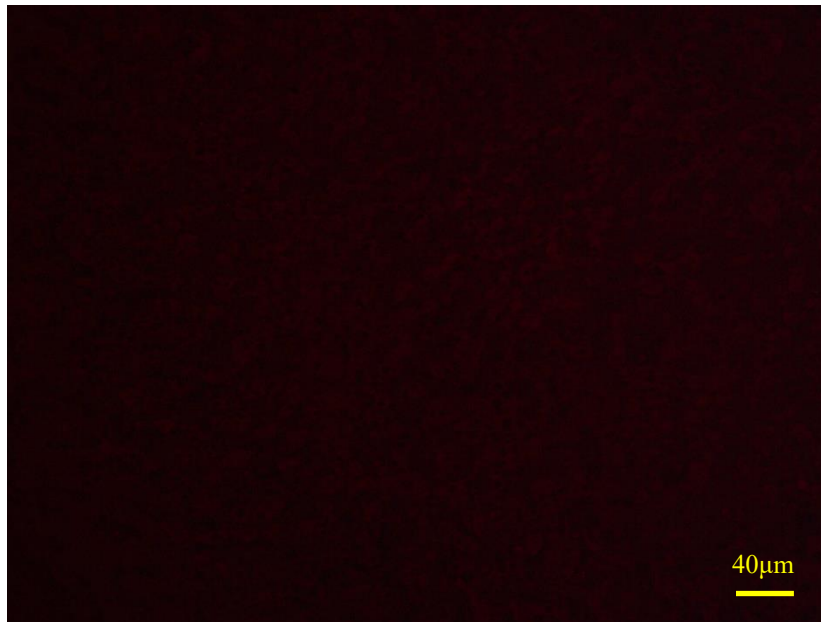
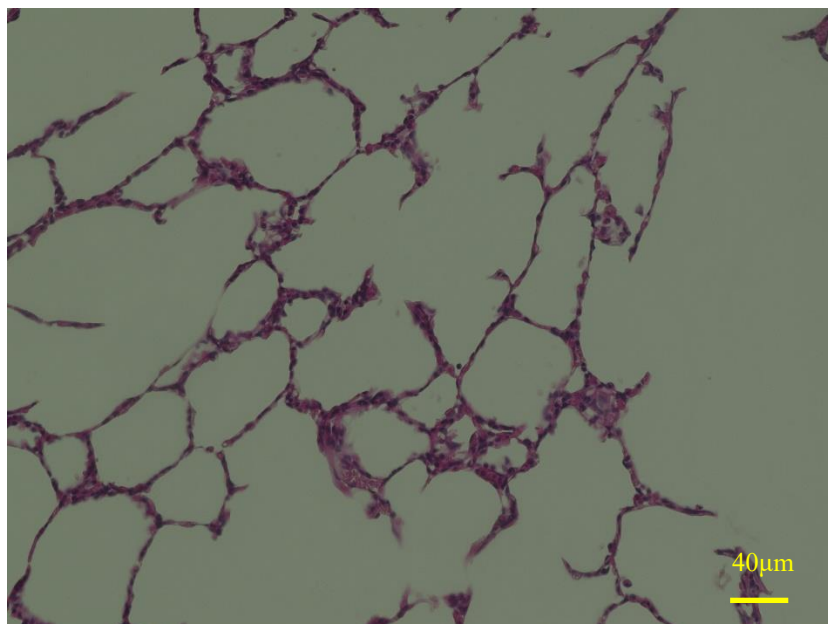


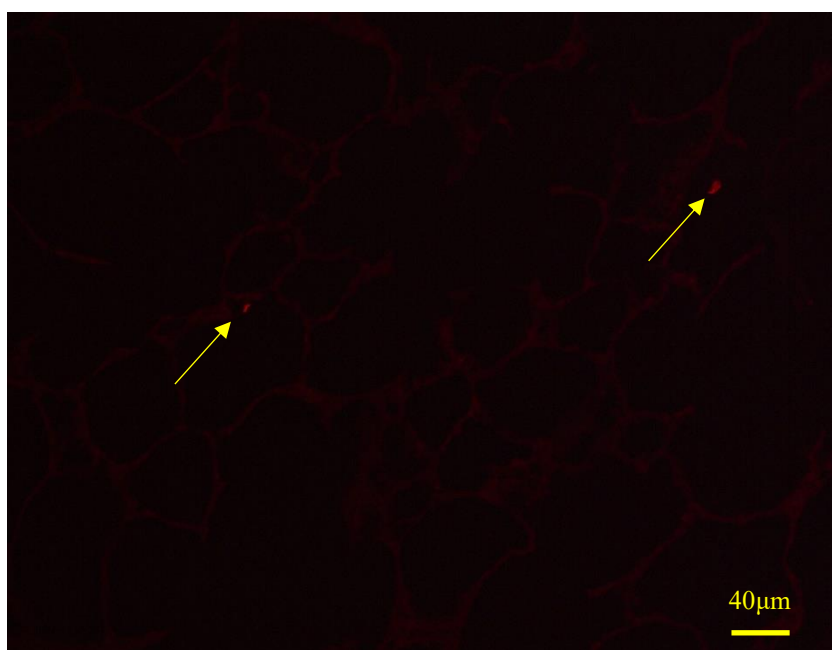
図 22 実験Ⅲ（ブタ）犠牲死時の肺組織中 ADSC（CM-dil）（×200）

（A）ADSC 群

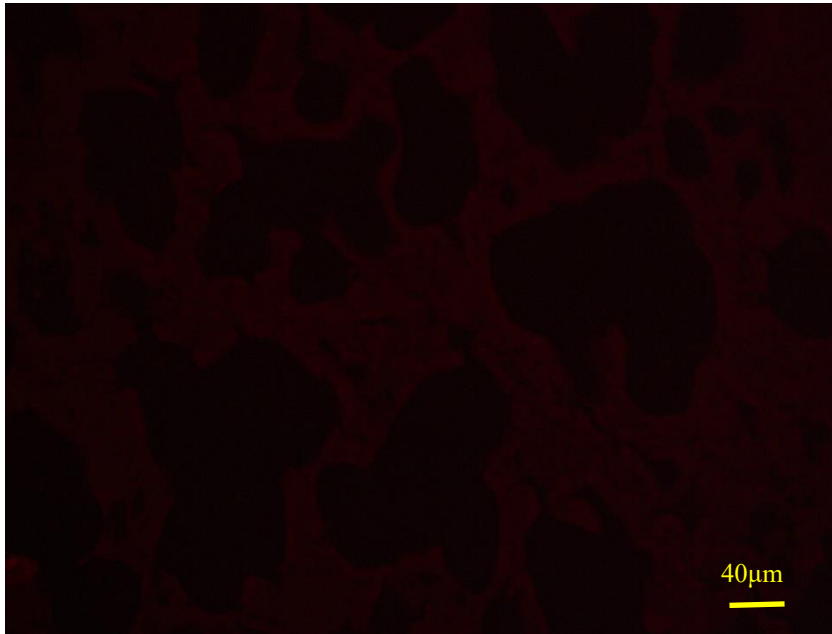
HE 染色所見



同部位の蛍光顕微鏡所見



(B) DCD 群 蛍光顕微鏡所見



表

表 1 ADSC 培養 通常培地

p=0 MF start medium(*TOYOBO, Co. Ltd, Osaka, Japan*)

10%FCS

1%penicillin-streptomycin

0.1%amphotericin B

0.1%gentamicin

p=1～MF medium(*TOYOBO, Co. Ltd, Osaka, Japan*)

1%FCS

1%penicillin-streptomycin

0.1%amphotericin B

0.1%gentamicin

p=passage, FCS=Fetal Calf Serum

表 2 実験 I 分化誘導培地

differentiating medium (incubate for 15 days)

Low glucose DMEM medium(MERCK, Co. Ltd,Darmstadt, Germany)

5% FBS

20 ng/mL FGF-4

20 ng/mL HGF

40 nmol/mL dexamethasone and ITS

FBS=Fetal bovine serum, FGF=fibroblast growth factor,

HGF=hepatocyte growth factor, ITS=Insulin-Transferrin-Selenium

表 3 各種保存液の組成

UW; University of Wisconsin solution, HTK; Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate solution

	UW	HTK	Celsior
Na (mmol/l)	30	15	100
K (mmol/l)	120	9	15
Mg (mmol/l)	5	4	13
Ca (mmol/l)	-	0.015	0.25
pH	7.4	7.1	7.3
Sulphate (mmol/l)	5	-	-
Phosphate (mmol/l)	25	-	-
Lactobionate (mmol/l)	100	-	80
Glutathione (mmol/l)	3	-	3
Raffinose (mmol/l)	30	-	-
Hydroxyethyl starch (g/l)	50	-	-
Adenosine (mmol/l)	5	-	-
Glutamate (mmol/l)	-	-	20
Allopurinol (mmol/l)	1	-	-
Histidine (mmol/l)	-	180	30
Tryptophan (mmol/l)	-	2	-
Ketoglutarate (mmol/l)	-	1	-
Mannitol (mmol/l)	-	30	60
Osmolarity (mOsm/Kg)	320	310	242-368

表 4 実験Ⅱ ラット背景因子

Group	Body weight(g)	Liver volume(g)	Agonal phase (seconds)
HB	305.80 ± 27.26	8.23 ± 0.91	-----
DCD	298.00 ± 23.45	8.75 ± 1.05	598.00 ± 161.00
ADSC-1	302.00 ± 39.17	8.21 ± 0.55	600.00 ± 63.64
ADSC-2	288.80 ± 22.03	7.97 ± 0.68	626.00 ± 158.57

mean ± SD n=5

死戦期の長さ，体重，肝重量は全ての群間で有意差を認めなかった．

表 5 実験Ⅲ ブタ背景因子

group	レシピエント体重 (kg)	肝グラフト重量 (g)	死戦期 (分)	無肝期 (分)
HB	28.1 ± 1.7	714.4 ± 43.5	-----	50.2 ± 8.5
DCD	30.0 ± 2.5	699.3 ± 31.7	4.6 ± 1.9	45.8 ± 9.7
ADSC	27.6 ± 2.0	709.7 ± 66.5	4.0 ± 1.7	43.0 ± 3.7

mean ± SD n=5

レシピエント体重，肝グラフト重量，死戦期，無肝期は，各群間で有意差を認めなかった。

Figure legends

図 1 温阻血再灌流障害イメージ

温阻血後の低酸素状態により細胞内の ATP が枯渇し、それに伴い ATPase 依存性ポンプの機能不全から肝細胞の膨化や類洞内皮の脱落を来し、類洞腔の狭小化から再灌流後の微小循環不全を引き起こす原因となる。また、再灌流時の Kupffer 細胞の活性化に伴う炎症性サイトカインの放出（サイトカインストーム）、好中球や補体の活性化などにより直接細胞障害や類洞内凝固が引き起こされる。これら微小循環障害と再灌流障害の相互作用が重度の機能低下をもたらすと考えられている。

図 2 ADSC 顕微鏡写真 (×200)

投与する MSC として容易に分離・培養可能な ADSC (swine adipose derived stem cells) を選択した。ADSC はブタ実験の際に採取できる家畜ブタ大網より脂肪幹細胞キット (Biomiraikoubou Co. Ltd, Tokyo, Japan) を用いて分離し培養した。図に示す通り, ADSC は接着性の細胞である。

図 3 実験Ⅱ (ラット肝灌流実験) プロトコール

全ての群で死戦期を経て心停止後 30 分間の温阻血時間を置き、肝臓を摘出し、6 時間の冷保存時間をおいた後、移植を想定し常温 (37℃) で 120 分間再灌流した。ADSC

投与について、投与なし (DCD 群), ADSC 2.0×10^5 (ADSC-1 群), ADSC 1.0×10^6 (ADSC-2 群) に分けて施行した。投与の際、ADSC は生理食塩水 2cc に溶解し回路の側管より 1 分間かけてワンショットした。60 分後、120 分後に検体を採取し、胆汁産生量、肝上部下大静脈からの流出液量も測定した。Control 群として、心拍動下に肝臓を摘出した HB 群を設定した。

図 4 実験Ⅲ（ブタ肝移植実験）プロトコール

以下の 3 群（各群 n=5）に分け、肝移植実験を行った。

- (1) 心拍動群 (Heart-beating; HB 群)：心拍動下に肝臓を摘出し移植する群。
- (2) 心停止群 (Donation after cardiac death; DCD 群)：心停止下に肝臓を摘出し移植する群。
- (3) ADSC 投与群 (swine adipose derived stem cell; ADSC 群)：心停止下に肝臓を摘出し移植する群。肝移植を行い閉腹した後、門脈血流再開の 2 時間後のタイミングで ADSC 1.0×10^7 を経門脈的に投与する群。

全ての群で、摘出した肝グラフトは 4 時間の冷保存を置き、その後肝移植（＋細胞移植）実験を施行した。

図 5 ADSC 分化誘導実験

- (A) 分化誘導培地にてわずかながら Albumin のバンド形成を認めた。

(B) 分化誘導培地において通常培地に比べ約 4 倍量の Albumin の PCR product を発現した。

図 6 実験 II (ラット) (A) 門脈灌流液量 (B) 胆汁産生量

(A) 門脈灌流液量は, HB 群に比べ DCD 群と ADSC-2 群で有意に減少した。

また, DCD 群と ADSC-1 群, ADSC-2 群との間では門脈灌流液量に有意差を認めなかった。

(B) 胆汁産生量は, HB 群に比べ DCD 群で有意に減少した。一方で, ADSC-2 群では増加し, DCD 群に対し有意差を認めた。

図 7 実験 II (ラット) 再灌流後の灌流液中肝逸脱酵素

AST 値, ALT 値は, 60 分後・120 分後ともにすべての群間で有意差を認めなかった。LDH 値は, 60 分後において HB 群に比べ DCD 群で有意に増加した。一方で, ADSC-1 群では DCD 群と比べ LDH 値の増加が有意に抑制された。120 分後においては, すべての群間で有意差を認めなかった。

図 8 実験 II (ラット) 再灌流後の灌流液中炎症性サイトカイン

灌流液中の TNF- α 濃度, 灌流液中 IL-1 β 濃度は, 60 分後・120 分後ともにすべての群間で有意差を認めなかった。

図 9 実験Ⅱ（ラット）再灌流後の灌流液中可溶性 ICAM-1

可溶性 ICAM-1 濃度は、60 分後・120 分後ともにすべての群間で有意差を認めなかった。

図 10 実験Ⅱ（ラット）肝組織中 ADP/ATP 比

肝組織中 ADP/ATP 比は HB 群に比べ、ADSC-2 群において有意に高値を示した。

図 11 実験Ⅱ（ラット）再灌流後の肝組織 HE 染色所見 （×200）

HB 群では類洞腔が広く保たれており、類洞構造は維持されていた。DCD 群では類洞内皮細胞の脱落と肝細胞の膨化により類洞は狭小化していた。中心静脈領域を中心に肝細胞の著明な空胞変性を広範囲で認めた。一方、ADSC-1、ADSC-2 群ではこれらの変化が軽度抑制されていた。

図 12 実験Ⅱ（ラット）開存類洞面積比（%）の解析

開存類洞面積比（%）の解析では DCD 群 (7.57 ± 2.34) に比べ HB (18.57 ± 3.35 , $P < 0.0001$), ADSC-1 (18.92 ± 2.58 , $P < 0.0001$), ADSC-2 群 (15.74 ± 2.30 , $P = 0.001$) で有意に高い開存率を示し、類洞腔が維持されていた。

図 13, 14 実験Ⅱ（ラット）再灌流後肝組織 TUNEL 染色所見（×200）および TUNEL 陽性細胞数

TUNEL 陽性細胞数は、HB 群に比べ DCD 群では有意に増加していた。また ADSC-1 群、ADSC-2 群では、DCD 群に比べ TUNEL 陽性細胞数が有意に少なかった。

図 15 実験Ⅲ（ブタ） 全個体の生死 生存曲線

HB 群は全例が 7 日間生存した。DCD 群は全例が 12 時間以内に PNF のため死亡した。ADSC 群は 5 例中 3 例が 7 日間生存し、1 例は 4 日目（88 時間後）、1 例は 2 日目（30 時間後）に PNF のため死亡した。ADSC 群は DCD 群と比べ有意に生存率が改善した。

図 16 実験Ⅲ（ブタ） 血清中肝逸脱酵素

血清 AST 値と ALT 値は、HB 群に比べ ADSC 群において再灌流 1 時間後で有意に高値を示した。有意差のあったタイミングについてはさらに棒グラフも追加して表示している。

血清 LDH 値は、各々の時点ですべての群間で統計学的有意差を認めなかった。

図 17 実験Ⅲ（ブタ） 血清中炎症性サイトカイン

血清 TNF- α 値は、各々の時点ですべての群間で統計学的有意差を認めなかった。

血清 IL-1 β 値は, DCD 群に比べ ADSC 群において再灌流 7 時間後で有意に低値を示した. 他の時点においてはすべての群間で統計学的有意差を認めなかった.

血清 IL-6 値は, DCD 群に比べ HB 群において再灌流 1 時間後で有意に低値を示し, ADSC 群に比べ HB 群において手術 7 日目に有意に低値を示した.

有意差のあったタイミングについてはさらに棒グラフも追加して表示している.

図 18 実験Ⅲ (ブタ) 犠牲死時の肝組織 HE 染色所見 (×200)

犠牲死時の標本にて, DCD 群で肝細胞の膨化が著明であったが, HB 群および ADSC 群は比較的肝構造が保たれていた.

図 19, 20 実験Ⅲ (ブタ) 再灌流 1 時間後の肝組織 TUNEL 染色所見 (×200) および TUNEL 陽性細胞数

犠牲死時に生検された組織中の TUNEL 陽性細胞数は, DCD 群に比べ HB 群, ADSC 群で有意に減少していた.

図 21 実験Ⅲ (ブタ) 犠牲死時の肝組織中 ADSC (CM-diI) (×200)

ADSC 群については肝組織中の同部位において光学顕微鏡 (HE 染色所見) と蛍光顕微鏡の両方で観察した. 肝組織中において肝細胞質内や類洞内皮・内腔に ADSC が存在するものと考えられた (矢印, 図 21A). コントロールとして DCD 群も蛍光顕微

鏡による観察を行い，蛍光色を示すものがないことを確認した（図 21B）．

図 22 実験Ⅲ（ブタ）犠牲死時の肺組織中 ADSC（CM-dil） （×200）

ADSC 群については肺組織中の同部位において光学顕微鏡（HE 染色所見）と蛍光顕微鏡の両方で観察した．肺組織中において ADSC が存在するものと考えられた（矢印，図 21A）．コントロールとして DCD 群も蛍光顕微鏡による観察を行い，蛍光色を示すものがないことを確認した（図 21B）．